



Caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* obtidos numa vinha com sintomas de declínio

Pedro Miguel Calhás Jorge Reis

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Co-orientador: Doutora Maria Helena Mendes da C. Ferreira Correia de Oliveira

Júri:

Presidente – Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais - Doutora Maria Helena Mendes da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia;

- Doutor Arlindo Lima, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.
- Doutor Pedro Manuel Vieira Talhinhas, Investigador Auxiliar do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro do Instituto de Investigação Científica Tropical;
- Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE QUADROS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
EXTENDED ABSTRACT	XII
1. PÉ NEGRO DA VIDEIRA	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2. NOTA HISTÓRICA E IMPORTÂNCIA ECONÓMICA	3
1.3. AGENTES CAUSAIS.....	7
1.3.1. Taxonomia e sinonímia.....	7
1.3.2. Características morfoculturais.....	10
1.3.2.1 Estados anamórficos e estados teleomórficos	10
1.4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ESCALA DE HOSPEDEIROS.....	18
1.5. SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA EM <i>VITIS</i> SPP.....	19
1.6. BIOECOLOGIA E BIOLOGIA	22
1.7. FACTORES CONDICIONANTES DA DOENÇA	23
1.8. MEIOS DE LUTA	23
1.8.1. Luta Cultural	24
1.8.2. Luta Química.....	25
1.8.3. Luta biológica	27
1.8.4. Mistos	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. ISOLADOS EM ESTUDO	31

2.2.	ISOLAMENTOS MICROBIOLÓGICOS E CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>CYLINDROCARPON</i>	32
2.3.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS	32
2.4.	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP.	33
2.4.1.	Condições de cultura dos isolados	33
2.4.2.	Extracção e quantificação do DNA	34
2.4.3.	Análise da variabilidade dos isolados de <i>Cylindrocarpon</i> spp.	35
2.4.3.1	Análise da variabilidade dos isolados por ISSR-PCR	36
2.4.3.2	Análise da variabilidade dos isolados por marcadores RAPD-PCR.....	38
2.5.	ESTUDO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. EM PLANTAS DE VIDEIRA (<i>VITIS VINIFERA</i>).....	39
2.5.1.	Obtenção de material vegetal	39
2.5.2.	Produção de inóculo, inoculação e condições de incubação	39
2.5.3.	Parâmetros avaliados	40
2.5.4.	Reisolamentos	40
2.5.5.	Delineamento experimental e análise estatística dos resultados	41
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1.	CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA.....	42
3.1.1.	Características morfológicas e biométricas dos conídios	46
3.2.	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	50
3.3.	DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. EM <i>VITIS</i> SPP.	53
3.3.1.	Porcentagem de reisolamentos.....	53
3.3.2.	Número total de raízes	54
3.3.3.	Comprimento da raiz maior.....	55
3.3.4.	Comprimento do lançamento maior	55
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXOS	70
	ANEXO A.....	71

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1.1. CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DOS CONÍDIOS DE <i>CYLINDROCARPON DESTRUCTANS</i> DE ACORDO COM DIFERENTES AUTORES	12
QUADRO 1.2. CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DE <i>NEONECTRIA RADICICOLA</i> DE ACORDO COM DIFERENTES AUTORES.....	13
QUADRO 1.3. CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DOS CONÍDIOS DE <i>CYLINDROCARPON LIRIODENDRI</i> DE ACORDO COM DIFERENTES AUTORES.	14
QUADRO 1.4. CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DOS CONÍDIOS DE <i>CYLINDROCARPON MACRODYDYMUM</i> DE ACORDO COM DIFERENTES AUTORES	16
QUADRO 1.5. LISTA DOS PAÍSES ONDE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. FORAM ASSINALADAS, AUTORES QUE AS DESCREVERAM E DESIGNAÇÃO DA ESPÉCIE(S)	18
QUADRO 1.6. LISTA DOS PAÍSES ONDE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. FORAM ASSINALADAS, AUTORES QUE AS DESCREVERAM E DESIGNAÇÃO DA ESPÉCIE(S) (CONTINUAÇÃO)	19
QUADRO 2.1. ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. OBTIDOS A PARTIR DE VIDEIRAS COM SINTOMAS DE DECLÍNIO: CÓDIGO ATRIBUÍDO, REFERÊNCIA ORIGINAL, CASTA E PORTA-ENXERTO (CULTIVAR E CLONE).	31
QUADRO 2.2. ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. UTILIZADOS NOS ESTUDOS DE VARIABILIDADE GENÉTICA: ISOLADO, DATA DE COLHEITA, LOCAL DE COLHEITA, HOSPEDEIRO, ESPÉCIE.....	34
QUADRO 2.3. CÓDIGOS E SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES ISSR (“INTER-SINGLE SEQUENCE REPEAT”)-PCR UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP.	36
QUADRO 2.4. PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA OS INICIADORES (TCC) ₅ E MR.	36
QUADRO 2.5. PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS PARA OS INICIADORES HVH(TG) ₇ E (AG) ₈ YT.	36
QUADRO 2.6. CÓDIGOS E SEQUÊNCIAS DOS OLIGONÚCLEÓTIDOS INICIADORES RAPD (“RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA”) UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP.	38
QUADRO 2.7. PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADO NA TÉCNICA RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA).....	38
QUADRO 3.1. CARACTERÍSTICAS CULTURAIS DE 33 ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. (CY) EM GELOSE DE BATATA DEXTROSADA (PDA), AO FIM DE DEZ DIAS, SOB CONDIÇÕES DE OBSCURIDADE E TEMPERATURA DE 20±1°C	44
QUADRO 3.2. CARACTERÍSTICAS BIOMÉTRICAS DOS CONÍDIOS DE 20 ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP. EM MEIO SNA, APÓS DEZ DIAS DE INCUBAÇÃO, À TEMPERATURA DE 20±1°C E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS. CY, ISOLADOS DE <i>CYLINDROCARPON</i> SPP...	47

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.1.** Sintomas associados ao pé negro da videira: a) declínio e morte de porta-enxertos em vinha após a plantação; b) vegetação reduzida e clorótica; c) avermelhamento das folhas; d) corte longitudinal da base de porta-enxerto infectado; e) corte longitudinal da zona da enxertia com necroses no lenho..... 21
- FIGURA 3.1.** Culturas de *Cylindrocarpon* spp. em meio PDA, ao fim de 10/12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. a e b, Cy239; c e d, Cy243; e e f, Cy241; g e h, Cy253; i e j, Cy233; l e m, Cy258; n e o, Cy 244; p e q, Cy260; r e s, Cy264; t e u, Cy261; v e x, Cy250; z e aa, Cy238; ab e ac, Cy245; ad e ae, Cy246..... 45
- FIGURA 3.2.** *Cylindrocarpon* spp. **a)** isolado Cy233 esporos com 1, 3 e 5 septos em meio SNA (spezieller Nährstoffarmer agar) ($\times 400$); **b)** isolado Cy238; **c) e d)** isolado Cy241, micro e macroconídios em meio SNA (spezieller Nährstoffarmer agar) ($\times 400$); **e) e f)** isolado Cy241, clamidóspors formados em meio de SNA ($\times 400$); **g)** isolado Cy255, conidióforo simples em meio SNA (spezieller Nährstoffarmer agar) ($\times 400$) **h)** isolado Cy238, conidióforo ramificado em meio de SNA (spezieller Nährstoffarmer agar) ($\times 400$)... 49
- FIGURA 3.3.** Dendograma resultante da análise por RAPD e ISSR de 51 isolados de *Cylindrocarpon* spp., produzido por UPMGA (Método de Agrupamento em Pares Não-balanceados usando Médias Aritméticas) sobre matrizes de similaridade (Dice). Em cada nó representam-se os valores percentuais de “bootstrap” calculados a partir de 2000 repetições da matriz de similaridade. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp. 52
- FIGURA 3.4.** Percentagens médias de reisolamentos, obtidas a partir de videiras da casta Touriga Nacional inoculadas com 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp. Cy, isolados de *Cylindrocarpon*, T, testemunhas. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD), a análise estatística foi efectuada, convertendo previamente os valores percentuais em $\arcsin\sqrt{x}$ 53
- FIGURA 3.5.** Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no número total de raízes, em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD). 54
- FIGURA 3.6.** Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no comprimento da raíz mais comprida (cm), em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD). 55
- FIGURA 3.7.** Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no comprimento do lançamento (cm), em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD). 56

LISTA DE ABREVIATURAS

5,8S – sub-unidade menor do ribossoma

ANOVA – análise de variância

CLA – Gelose de folha de Craveiro

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleótidos trifosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

ISA – Instituto Superior de Agronomia

ISSR – Inter-simple Sequence Repeat

ITS – Internal Transcribed Spacer

LPVVA – Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”

OA – Oat Meal

pb – pares de bases

PCR – Reacção em cadeia da Polimerase

PDA – Potato Dextrose Agar

PDB - “Potato Dextrose Broth”

PSA – Potato Sucrose Agar

RAPD – DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente

rDNA – Ácido Desoxirribonucleico ribossomal

SDW – Água destilada e Esterilizada

SNA – “Spezieller Nährstoffarmer Agar”

SSU – sub-unidade pequena de rDNA mitocondrial

TBE- Tris + Ácido Bórico + Ácido Etilenodiaminotetracético

TE – Tampão de extracção

UPGMA – Método de Agrupamento em Pares Não-balanceados usando Médias Aritméticas

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Investigadora Cecília Rego pela sua orientação durante este trabalho. Quero agradecer também o seu apoio, os seus ensinamentos, a sua disponibilidade, e a sua paciência ao longo de todo este processo. Um especial obrigado pelas conversas ao longo de todo este tempo e pela ajuda nesta fase final e tão crucial.

À Professora Helena Oliveira, como co-orientadora deste trabalho, pela indicação do caminho a seguir e pela sugestão deste tema, assim como pela disponibilidade para aconselhar e esclarecer as imensas dúvidas que surgiram ao longo deste processo, o meu especial agradecimento.

Quero também agradecer a ajuda e disponibilidade total demonstradas pela Eng. Teresa Nascimento durante os ensaios de biologia molecular. Por todos os ensinamentos, esclarecimentos e paciência, o meu especial obrigado.

À Eng. Ana Cabral, um especial agradecimento pela ajuda em todo este trabalho. Pela ajuda no processamento dos resultados de biologia molecular, por todos os conselhos nas metodologias a adoptar durante as diferentes fases deste trabalho, pela sua ajuda durante a minha pesquisa bibliográfica e pelas inúmeras explicações sobre este tema, ficarei eternamente grato.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida”, Amélia Marques, Olga Nogueira e Joaquim Antunes, por toda a ajuda prestada na preparação de meios de cultura e durante todo o trabalho de estufa.

Um agradecimento muito especial aos meus colegas Eng.^a Patrícia Pinto, Eng.^a Ana Teresa Vaz e Doutor Damiano Vessentini, pela enorme disponibilidade para me ajudar durante este trabalho, mas acima de tudo pela amizade e apoio que sempre demonstraram para comigo. Fomos e ainda somos o que se chama um “grupo engraçado”.

Um muito obrigado por todo o apoio e amizade demonstrados pela Eng.^a Marta Duarte Santos e pela Eng.^a Sara Belchior ao longo de todo este trabalho.

Aos meus colegas de curso Eng. João Cortes e Nuno Morais, o meu profundo agradecimento pelas inúmeras noites, que apenas podem ser descritas como “épicas”, pelos inúmeros obstáculos que ultrapassamos juntos e por toda a ajuda e apoio que me deram, nem que fosse fazer-me rir na altura certa. Em especial para o Nuno Morais, um muito obrigado pelas conversas a altas horas da noite, durante a realização da parte escrita deste trabalho, e também, pela companhia prestada em refeições fora de horas.

Aos meus amigos de longa data Ricardo Santos, Pedro Guerra e Ana Margarida Gonçalves, o meu mais profundo agradecimento por todo o apoio, ajuda e acima de tudo amizade incondicional que demonstraram para comigo durante todos estes anos, fosse onde fosse e a que hora fosse. Obrigado pelas palavras amigas, pelas longas conversas, pelos longos desabafos, e pela paciência que demonstraram para comigo durante as fases menos boas do meu curso e da minha vida. Não quero deixar de agradecer também o apoio e amizade da minha amiga, de não tão longa data, Celine de Wit. Obrigado por todo o teu apoio e amizade, desde os tempos “online” até à actual data.

Quero dedicar um especial agradecimento à, também colega de curso, Ana Sofia Santos por todo o apoio durante uma fase especialmente complicada que coincidiu com decorrer deste trabalho e, um muito obrigado também por esse apoio e amizade se manterem até à presente data.

Quero deixar também um agradecimento à Ariana Margarida por todo o teu apoio, amizade. Obrigado por todas as nossas longas conversas, por todo o apoio prestado nos últimos anos e por tantas provas de amizade que me deste.

Um muito obrigado ao Dr. José Faísca, por todos os ensinamentos prestados e acima de tudo por ser um verdadeiro mentor, no que diz respeito a profissionalismo e ética profissional. Por me teres ensinado tanta coisa, por todo o apoio e compreensão e por tantos conselhos dados a altas horas da noite depois de dias de 14/15 horas de trabalho (por vezes mais), um agradecimento muito especial.

Ao meu colega de trabalho Henrique Bastos, um especial obrigado, por toda a amizade, por todo o apoio e por tantas vezes me “desenrascar” a nível de trabalho. Tu melhor do que ninguém sabes o difícil que é conciliar um trabalho como o nosso com um mestrado.

A todos os colegas e amigos que me acompanharam ao longo de todo o curso, e que me marcaram de alguma maneira, um muito obrigado.

Por fim, o meu mais especial e profundo agradecimento, à minha família.

Um muito obrigado ao meu Pai, que apesar de por vezes me fazeres perder a paciência, também foste importante ao longo destes anos. Obrigado pela tua amizade, companheirismo e pelo amor demonstrado por mim.

À minha irmã por todo o teu apoio e amizade, por todo o amor e carinho demonstrado para comigo, por toda a ajuda que me deste para me “libertar” de compromissos e poder dedicar-me aos meus projectos, especialmente neste final atribulado de curso, o meu profundo obrigado. Também tu foste essencial para que tudo chegasse a “bom-porto”.

Aos meus avós por todo o amor e carinho, por toda a compreensão e por todos os ensinamentos e transmissão de valores que me deram ao longo dos anos, um agradecimento muito especial.

Por último, mas sem dúvida a mais importante, à minha Mãe por ser o meu pilar, por ser a quem devo o que sou hoje, pela oportunidade de realizar este curso, pelo apoio prestado durante toda a minha vida e acima de tudo pelo esforço e amor prestados ao longo de toda a minha vida, um enorme obrigado. Sem ti nada disto teria sido possível, nem teria conseguido chegar onde estou hoje.

RESUMO

O pé-negro da videira é uma importante doença causada por *Cylindrocarpon* spp., sendo as espécies *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* e *C. pauciseptatum* as mais importantes. A doença origina necroses na zona basal da videira, conduzindo ao declínio precoce e à morte de cepas jovens. No presente estudo procedeu-se à caracterização de 33 isolados do género *Cylindrocarpon* provenientes de uma vinha localizada no concelho da Vidigueira, Alentejo. Foram analisadas as características morfológicas, culturais e biomoleculares dos isolados, de forma a avaliar a variabilidade inter e intra-específica existente na colecção. Os dados morfo-culturais e biomoleculares (RAPD e ISSR) permitiram identificar *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* e *C. pauciseptatum* e três outras espécies ainda sem designação atribuída (*Cylindrocarpon* sp3, sp4 e sp12). Um isolado (Cy233) revelou-se distinto de todos os outros, podendo representar uma espécie nova. Realizaram-se testes de patogenicidade em videiras da casta Touriga Nacional, mantidas em estufa de campo. Os sintomas produzidos e as percentagens de reisolamento obtidas confirmaram a patogenicidade de todos os isolados. As percentagens mais elevadas de reisolamento foram alcançadas para isolados de *Cylindrocarpon* sp4.

Palavras chave: *Vitis vinifera*, Pé-negro, *Cylindrocarpon* spp., caracterização, patogenicidade.

ABSTRACT

Black-foot of grapevine is an important disease caused by *Cylindrocarpon* spp., being *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum* the most important species. The disease causes necrosis in the basal-end of the rootstock, leading to the early decline and death of young vines. In the present study, 33 isolates of the genus *Cylindrocarpon*, obtained from a vineyard located in the Vidigueira County, Alentejo, were characterized. To assess the inter- and intra-specific variability in the existing collection, morphological, cultural and biomolecular characteristics of the isolates were evaluated. Morpho-cultural and molecular data (RAPD and ISSR) allowed the identification of *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum*. Further, three other species (*Cylindrocarpon* sp.3, sp.4 and sp.12), not named yet, were identified. One isolate (Cy233) showed to be distinct from all the others and it is most likely a representative of a new *Cylindrocarpon* species. Nevertheless, more studies are needed to confirm this hypothesis. A greenhouse experiment was conducted to establish the pathogenicity of the most representative *Cylindrocarpon* isolates (30), by artificial inoculation on rooted plants of cultivar Touriga Nacional. As indicated by the symptoms produced and by the percentage of reisolation, pathogenicity was confirmed for all isolates. The highest percentages of reisolation were achieved for isolates belonging to *Cylindrocarpon* sp4.

Key words: *Vitis vinifera*, Black-foot disease, *Cylindrocarpon* spp., characterization, pathogenicity.

EXTENDED ABSTRACT

Several species of *Cylindrocarpon* are responsible for the black-foot disease of grapevine. The most important species are considered to be *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum*. In recent years, this disease has been responsible for sizable damages and losses in young vineyards and grapevine nurseries. Black-foot disease causes root mass reduction, necrosis on the basal-end, of the rootstock, extendable to the grafting region and the pathogens involved are capable of causing early decline and death of young plants.

Black foot disease of grapevine was first considered to be associated with *Cylindrocarpon destructans* and *Cylindrocarpon obtusiporum*. In recent years the taxonomy of the genus *Cylindrocarpon* suffered several alterations, including the discovery that *Cylindrocarpon destructans* is not a single species but a species complex. Further, there are several evidences supporting the misidentification of *C. obtusiporum* from grapevine. Isolates earlier identified as *C. obtusiporum* will be, most likely, *C. macrodidymum*. Also, several isolates previously described as *C. destructans* have proven to be *C. liriodendri*. Moreover, another species, *C. pauciseptatum*, arise associated with grapevine roots.

So, despite challenges to resolve the species complex *Cylindrocarpon destructans*, further research is needed to disentangle the *taxa* previously accommodated in *C. destructans*.

In the light of those recent achievements, our goal was to characterize a collection of *Cylindrocarpon* isolates obtained in Portugal, using the new taxonomy, in order to clarify the identity of species which are currently occurring in the country associated with black foot of grapevine.

In the present work, morphological, cultural and molecular characteristics of 33 *Cylindrocarpon* spp. isolates were studied in order to characterize a collection obtained from a single vineyard located at Vidigueira, Alentejo. Cultural characters of isolates were described in Potato Dextrose Agar (PDA) and Oatmeal Agar (OA) and conidial size (length and width) determined in “Spezieller Nährstoffarmer Agar” (SNA). The molecular analysis of isolates was carried out by ISSR (Inter-single sequence Repeat) Primed PCR and RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) Primed PCR.

These studies led to the identification of the following species: *C. liriodendri* (6 isolates) *C. macrodidymum* (3 isolates), *C. pauciseptatum* (2 isolates) and *Cylindrocarpon* sp3 (1 isolate), *Cylindrocarpon* sp4 (19 isolates) and *Cylindrocarpon* sp12 (1 isolate). One isolate (Cy233) emerged from the others, as soon as its cultural features were observed. Although the mycelium texture was similar to the other *Cylindrocarpon* cultures, its color was unusual,

and molecular data showed dissimilarity from the remaining isolates. Therefore, the isolate Cy233 will probably be a representative of a new species of the *Cylindrocarpon* genus.

Thirty *Cylindrocarpon* isolates were artificially inoculated on grapevine potted plants (*in vivo* assays), cultivar “Touriga Nacional”, growing under greenhouse conditions, in order to complete the pathogenicity tests. Six months after inoculation, it was possible to reisolate *Cylindrocarpon* isolates from all inoculated plants but from the control. These results confirmed the pathogenicity of all isolates, regardless their identity. The highest percentage of reisolations was achieved with three isolates belonging to *Cylindrocarpon* sp4. All isolates caused the necrosis of the basal-end of the plant, and (albeit with some variation) reduction of the following parameters: root mass, length of the longest root and length of the main shoot. Pathogenicity of isolate Cy233 to *Vitis vinifera* was confirmed, although it appeared as less virulent than the remaining isolates.

In order to complete a proper identification of Cy233, further studies will be developed.

1. PÉ NEGRO DA VIDEIRA

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Na presente dissertação estudou-se o agente responsável pelo pé-negro da videira e o seu envolvimento no declínio e morte de videiras jovens. Esta é uma grave doença em praticamente toda a área vitícola mundial, e pode ser responsável por avultados prejuízos, tanto em vinhas jovens como em viveiros vitícolas.

Várias espécies de *Cylindrocarpon* Wollenw. foram associadas ao pé negro da videira (Halleen *et al.*, 2004, 2006b). O género *Cylindrocarpon* (teleomorfo *Neonectria* Wollenw.) possui mais de 125 espécies descritas (Booth, 1966; Schroers *et al.*, 2008). Algumas destas espécies são patogénicas para um grande número de plantas, infectando-as através de feridas e das raízes, enquanto outras são conhecidas como saprófitas comuns do solo e de detritos de plantas mortas.

A doença do pé negro da videira foi assinalada pela primeira vez, em Portugal, no ano de 1994, na região do Oeste, em videiras jovens que apresentavam sintomas de declínio e, mais tarde, foi associada à morte de plantas dos porta-enxertos 99 R e 110 R, em vinhas do Alto Alentejo (Rego, 1994).

Durante a última década, a incidência de doenças do lenho da videira aumentou significativamente nas áreas vitícolas mundiais, particularmente em viveiros e vinhas jovens. Consequentemente, existe um renovado interesse no estudo destas doenças e dos seus agentes causais, entre eles, o pé-negro da videira, causado por *Cylindrocarpon* spp. (Alaniz *et al.*, 2007).

As vinhas afectadas pelo pé-negro apresentam necroses a nível radicular com redução do número de raízes. A remoção do ritidoma revela pontuações negras, e observam-se necroses dos tecidos do lenho, que se desenvolvem a partir da base do tronco (sintoma que levou à designação vulgar da doença). Outros sintomas incluem perda de vigor, entrenós curtos, menor número de folhas, que surgem mais pequenas, com cloroses e necroses (Grasso, 1984; Maluta & Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998a; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2006a,b).

A presença de *Cylindrocarpon* spp. no solo tem sido considerada como a mais importante causa de manifestação da doença em viveiros e vinhas jovens, contribuindo para a incidência da doença. Foi demonstrado em Portugal e na África do Sul que novas infecções se estabelecem quando as estacas de porta-enxertos ou os

enxertos-prontos entram em contacto com o solo infectado do viveiro (Oliveira *et al.*, 2003, Rego, 2004, Halleen *et al.*, 2003, 2006a).

O pé-negro esteve durante décadas associado a duas espécies do género *Cylindrocarpon*, *C. destructans* (Zinns.) Scholten (anamorfo *Neonectria radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels) e *C. obtusisporum* (Cooke & Harkn.) Wollenw. Estudos taxonómicos recentes, revelaram uma nova espécie, *C. macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous (anamorfo de *Neonectria macrodydima* Halleen, Schroers & Crous), associada à doença. É possível que a espécie *C. macrodidymum* tenha sido incorrectamente identificada em videiras como *C. obtusisporum* (Halleen *et al.*, 2006b). Apesar de *C. destructans* aparentar ser a espécie dominante associada à doença do pé-negro, pesquisa recente revelou que este taxon é na realidade um complexo (Samuels & Brayford, 1990; Seifert *et al.*, 2003).

Recentemente, Halleen *et al.* (2006b) compararam isolados de *C. destructans* obtidos em vinhas doentes em França, Portugal e África do Sul, com outras espécies do género *Cylindrocarpon*. Os resultados revelaram que *C. destructans* e *C. liriodendri* tinham caracteres morfológicos, ITS e sequências parciais da beta-tubulina idênticos. Consequentemente todos os isolados de *C. destructans* incluídos no referido estudo, foram re-identificados como *C. liriodendri*.

Assim, hoje em dia, *C. liriodendri* e *C. macrodydimum* são considerados os principais agentes causais da doença do pé-negro (Halleen *et al.*, 2004, 2006b). Recentemente, foi ainda descrita uma terceira espécie de *Cylindrocarpon*, associada a raízes de videira, *Cylindrocarpon pauciseptatum* Schroers & Crous (Schroers *et al.*, 2008). A patogenicidade desta espécie, para o porta-enxerto 110-R foi confirmada por Alaniz *et al.* (2009a). No entanto, o envolvimento de *C. pauciseptatum* como agente causal da doença do pé-negro ainda não foi totalmente elucidado até à presente data (Alaniz *et al.*, 2010).

As alterações sofridas pelos fungos do complexo *C. destructans*, a nível taxonómico, obrigam a uma reavaliação da identidade dos isolados nacionais, presumivelmente causadores de pé-negro da videira e anteriormente enquadrados neste complexo. Assim, foram objectivos do presente estudo:

- 1- Actualizar o conhecimento sobre o pé-negro da videira e a taxonomia dos seus agentes causais, com referência à sintomatologia, bioecologia e principais meios de luta contra a doença.

2- Determinar a identidade dos isolados de *Cylindrocarpon* spp., associados ao pé-negro da videira em Portugal, à luz dos recentes desenvolvimentos taxonómicos e usando como estudo de caso uma colecção de isolados provenientes de uma vinha jovem, localizada no Concelho da Vidigueira, Alentejo, que denotava elevada incidência e severidade da doença.

3- Avaliar a patogenicidade dos isolados obtidos, relativamente à videira, de forma a esclarecer o seu envolvimento como agentes causadores do pé-negro da videira.

Para cumprir estes objectivos usou-se uma colecção de isolados de *Cylindrocarpon* spp., depositada no Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” (LPVVA), bem como isolados de referência da colecção do LPVVA e do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands), tendo-se procedido à realização dos seguintes estudos:

- Caracterização morfológica e cultural de uma colecção de 33 isolados de *Cylindrocarpon* spp..
- Avaliação da variabilidade genética dos isolados com recurso a marcadores ISSR e RAPD para a distinção das espécies.
- Determinação da patogenicidade dos isolados em plantas de videira envasadas da casta Touriga Nacional.

1.2. NOTA HISTÓRICA E IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

A primeira referência ao fungo *C. obtusisporum* (Cooke & Harkness) Wollenw. é feita por Cooke e Harkness em 1884, ao descreverem uma podridão radicular em *Acacia* spp. que atribuem a *Fusarium obtusisporium*, sinónimo de *C. obtusisporum*. Relativamente a *C. destructans* (Zins.) Scholten, a primeira referência é feita por Zinssmeister (1918) que descreve uma podridão radicular em “ginseng” (*Panax quinquefolium* L.) e a atribui a *Ramularia destructans* Zins., sinónimo de *C. destructans*.

Em videira, a doença causada por *C. destructans* foi pela primeira vez assinalada na região de Victória, na Austrália, em 1956 (Taylor, 1956). Mais tarde, na Rússia,

Mil'ko (1959) relatou o isolamento sistemático de *C. destructans* a partir de raízes e da rizosfera de videiras atacadas por filoxera.

Em Itália, Grasso & Magnano di San Lio (1975) isolaram o fungo *C. obtusisporum*, a partir de porta-enxertos 225 Ruggeri com sintomas de declínio, em viveiro. Posteriormente, em 1984, os fungos *C. destructans* e *Fusarium oxysporum* Schlecht surgiram como um complexo responsável pelo declínio de videiras jovens das castas Nerello Mascalese, Cilegiuolo, Nerello Calabrese, Sangiovese, Montepulciano, Inzoliae e Itália, enxertadas no porta-enxerto 140 Ruggeri, na zona Este da Sicília (Grasso, 1984).

Em França, durante os anos sessenta, a doença foi inicialmente denominada como “gangrena” nos vinhedos de Champagne e de Charentes, tendo sido inicialmente atribuída a causas fisiológicas. No início dos anos 90, a doença reapareceu e Larignon identificou o fungo *C. destructans* como agente causal desta doença (Maluta & Larignon, 1991; Dubos, 1999), tendo sido registadas perdas superiores a 50% em vinhas com 2 a 8 anos de idade (Larignon, 1999). Actualmente, esta doença continua a ter grande incidência nos vinhedos das regiões de Champagne e Charentes, sendo esporádica nas restantes regiões vitícolas francesas.

Nos EUA, o pé negro é considerado a doença mais grave das vinhas jovens, na zona Norte da costa da Califórnia. Foram isolados tanto *C. destructans* como *C. obtusisporum*, sendo a última espécie a mais frequente (Scheck *et al.*, 1998a, 1998b, Gubler *et al.*, 2004).

Na Grécia, desde 1998, tem-se verificado um aumento da incidência do declínio das vinhas jovens, causado por um complexo de fungos do lenho, entre os quais se identificou o género *Cylindrocarpon*. Estes fungos foram isolados em percentagens relativamente baixas (1-4%), a partir da zona de enxertia e da zona basal de porta-enxertos de videiras jovens (Rumbos & Rumbou, 2001).

Em Espanha, Armengol *et al.* (2001) analisaram a ocorrência de fungos do lenho da videira com sintomas de declínio, isolando *Cylindrocarpon* spp. em 28,7% das vinhas. Posteriormente, em análises efectuadas a plantas com sintomas de declínio provenientes da região de Castela e Leão, fungos do género *Cylindrocarpon* spp. foram isolados em 11% das plantas (Sánchez *et al.*, 2004).

Na Austrália, entre 1998 e 2002, foram analisadas plantas com sintomas de declínio, “dieback”, falha na enxertia ou esca, provenientes de vinhas e viveiros, tendo-se isolado *Cylindrocarpon* spp. em 10% das amostras. Os fungos surgiram sempre

associados a sintomas de declínio e a plantas com menos de 5 anos (Edwards & Pascoe, 2004).

Na África do Sul, análises efectuadas a plantas jovens com sintomas de declínio (na maioria com 5 anos ou menos), revelaram que 51,7% estavam infectadas com pé negro, tendo sido isolados tanto *C. destructans* como *C. obtusisporum* (Fourie & Halleen, 2001b). Apesar de *C. destructans* aparentar ser a espécie dominante, associada ao pé negro (Halleen *et al.*, 2004), estudos recentes indicaram que este *taxon* é na verdade um complexo (Samuels & Brayford, 1990; Seifert *et al.*, 2003), e que a espécie dominante nas vinhas Sul-africanas é na realidade *C. liriodendri* (Halleen *et al.*, 2006b), e não *C. destructans* como reportado anteriormente (Halleen *et al.*, 2004).

A taxonomia dos agentes causais do pé negro da videira foi revista recentemente por Halleen *et al.* (2004, 2006b). Estes estudos incluíram caracteres morfológicos e análises filogenéticas de 4 *taxa* de *Cylindrocarpon* e *Cylindrocarpon-like*, isolados a partir de videiras com e sem sintomas, provenientes de diferentes continentes. Foram reconhecidos três grupos principais. Um grupo de isolados foi descrito como uma nova espécie, *C. macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous (*Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers & Crous), que incluía isolados provenientes da Austrália, Canadá, Nova Zelândia e Austrália (Abreo *et al.*, 2010). Recentemente, *C. macrodidymum* foi também identificado nos EUA (Petit & Gubler, 2005), Chile (Auger *et al.*, 2007) e Espanha (Alaniz *et al.*, 2007). O segundo grupo de isolados foi definido como um novo género: *Campylocarpon* Halleen, Schroers & Crous, que contém até à presente data duas novas espécies, *Ca. fasciculare* Schroers, Halleen & Crous e *Ca. pseudofasciculare* Halleen, Schroers & Crous descritas a partir de isolados provenientes da África do Sul (Abreo *et al.*, 2010). O terceiro grupo de isolados incluía espécies do complexo *C. destructans/Neonectria radicola* (Gerlach & L. Nilsson) Mantiri & Samuels, representadas por isolados provenientes de França, Nova Zelândia e África do Sul. Este complexo foi descrito como um agregado de espécies filogeneticamente aparentadas, baseado em estudos de isolados provenientes de angiospérmicas e coníferas (Seifert *et al.*, 2003).

Posteriormente Halleen *et al.* (2006b), estudaram isolados morfologicamente atribuídos ao complexo *C. destructans/Neonectria radicola* e concluíram que todos os isolados provenientes de videiras deveriam ser atribuídos a *Neonectria liriodendri* Halleen, Rego & Crous, o teleomorfo de *Cylindrocarpon liriodendri* J.D. MacDon. & E. E. Butler, uma espécie previamente associada a raízes de *Liriodendron tulipifera* nos

EUA (MacDonald & Butler, 1981). *C. liriondendri* foi reportado em videiras, em França, Portugal, África do Sul (Halleen *et al.*, 2006b), Austrália (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007), EUA (Dubrovsky & Fabritius, 2007; Petit & Gubler, 2007), Espanha (Alaniz *et al.*, 2007) e Irão (Mohammadi *et al.*, 2009).

Recentemente uma nova espécie, *Cylindrocarpon pauciseptatum*, foi reportada em videira, a partir de isolados provenientes da Nova Zelândia e Eslovénia (Schroers *et al.*, 2008).

Em Portugal, o fungo *C. destructans* foi assinalado em vinhas jovens da região Oeste e, mais tarde, em diversas vinhas do Alto Alentejo, como o agente causal de declínio e morte de jovens videiras e de porta-enxertos (Rego, 1994). Desde então, a doença tem sido assinalada em vinhas jovens de diversas regiões e em material de propagação vegetativa proveniente das regiões do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral. O patógeno foi isolado a partir de plantas de diferentes castas/porta-enxertos, tanto a partir da zona basal dos porta-enxertos como da zona de enxertia das videiras. Prospekções efectuadas em viveiros vitícolas, ao longo de 3 anos, permitiram a detecção de *C. destructans* em 37% das plantas analisadas (maioritariamente bacelos), de um total de 3340 plantas (Oliveira *et al.*, 1998a; Rego *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000; Rego, 2004).

O pé-negro da videira tem elevada importância económica, que decorre principalmente desta surgir numa fase precoce da vida das plantas, logo após a plantação, ou um pouco mais tarde, já em fase de produção (até 8-10 anos de idade). Nestas circunstâncias, há necessidade de substituir as plantas doentes, o que acarreta elevados custos, nomeadamente, o custo das plantas, o acréscimo do tempo de trabalho, o desajustamento da produção das plantas substituídas e limitações na aplicação de herbicidas. No caso de situações extremas, de elevada severidade da doença, a viabilidade económica da vinha pode ser comprometida (Dubos, 1999; Dumot *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2003). Quanto à situação verificada nos viveiros, a ocorrência de pé-negro dificulta a selecção de materiais vegetativos sãos, diminui a produção e o rendimento do viveiro e acarreta prejuízos decorrentes da necessidade de substituição das plantas doentes (Dubos, 1999; Dumot *et al.*, 1999).

Durante a última década, a incidência de doenças do lenho da videira causadas por fungos tem aumentado significativamente, nas principais regiões vitivinícolas a nível mundial, particularmente em viveiros e vinhas jovens. As causas para este recrudescimento estão pouco elucidadas e os meios de luta disponíveis são ainda muito restritos, ou inexistentes. Consequentemente, verifica-se um interesse renovado

na pesquisa sobre estas doenças e os seus agentes causais, entre elas, o pé-negro da videira, causado por *Cylindrocarpon* spp.

1.3. AGENTES CAUSAIS

1.3.1. Taxonomia e sinonímia

O género *Cylindrocarpon* foi introduzido por Wollenweber (1913) para designar anamorfos de *Nectria* Fr., secção Wilkommiiottes Wollenw. (actualmente anamorfos de *N. coccinea*). Posteriormente, Wollenweber (1917) ampliou o conceito de *Cylindrocarpon* de modo a incluir espécies que formam clamidósporos, secção *Chlamydospora* (anteriormente classificadas no género *Ramularia* Unger e as espécies sem clamidósporos, secção *Ditissima* (Wollenweber, 1917; Booth, 1966).

Booth (1966) delineou quatro grupos morfológicos, dentro do género *Cylindrocarpon*, baseando-se na presença ou ausência de microconídios e/ou produção de clamidósporos miceliais em cultura. As espécies do primeiro grupo produzem microconídios em abundância mas não produzem clamidósporos miceliais. As espécies do segundo grupo não produzem microconídios nem clamidósporos miceliais. As espécies do terceiro grupo produzem microconídios e clamidósporos miceliais. As espécies do grupo quatro produzem clamidósporos miceliais mas não produzem microconídios. Segundo esta classificação, as espécies *C. destructans* e *C. obtusisporum* pertencem ao grupo três de Booth (1966). Estas espécies distinguem-se de *Fusarium solani* Sn. & H. pela ausência de uma célula basal pediforme nos macroconídios e pela cor castanha dos clamidósporos (Booth, 1966). Esta divisão em grupos morfológicos, embora fornecesse uma chave dicotómica simples para a identificação das espécies do género *Cylindrocarpon*, não deixava de ser artificial, dado que espécies próximas eram colocadas em grupos diferentes (Samuels & Brayford, 1990).

A designação actual de *C. destructans* deve-se a Scholten (1964). No entanto, inicialmente o fungo foi designado *Fusarium polymorphum* Marchal e considerado sinónimo de: *Ramularia macrospora* Wollenw. (Wollenweber, 1913), *Ramularia destructans* Zins. (Zinssmeister, 1918) e *C. radicola* Wollenw. (Wollenweber, 1928).

O teleomorfo de *C. destructans* foi descrito e assinalado, pela primeira vez por Gerlach & Nilson (1963), que observaram, sobre folhas, pedúnculos e bolbos de *Cyclamen persicum* L., peritecas de uma espécie de *Nectria* que designaram por

Nectria radicola Gerlach & Nilson, em virtude do anamorfo resultante da germinação dos ascósporos, ser idêntico a *C. radicola*, actualmente *C. destructans*.

Posteriormente (1999), o género *Nectria sensu lato* foi revisto taxonomicamente, tendo sido limitado a um grupo de espécies, ou seja *Nectria sensu stricto*, com características morfológicas e anatómicas bem definidas e homogêneas, de entre as quais se destacam a formação de peritecas vermelhas e anamorfos pertencentes ao género *Tubercularia*. Posteriormente, as espécies cujas peritecas diferiam morfológica e anatomicamente das referidas anteriormente e cujos anamorfos pertenciam ao género *Cylindrocarpon* foram reclassificadas como *Neonectria* Wollenw. (Rossman *et al.*, 1999).

Schoch *et al.* (2000) provaram que o género *Neonectria* era verdadeiramente monofilético, com base na amplificação da região correspondente ao gene da unidade ribossomal 5,8S, bem como das regiões ITS1 (Internal Transcribed Spacer) e ITS2 e, ainda, da extremidade 5' do gene da β -tubulina. Foram alcançados resultados semelhantes por Mantiri *et al.* (2001) que analisaram, para algumas espécies de *Nectria*, as sequências da pequena subunidade de rDNA mitocondrial (mtSSU), em conjunto com as características fenotípicas, tendo-as transferido para *Neonectria*. De entre as espécies estudadas, figurava *Nectria radicola* (teleomorfo de *C. destructans*), que passou então a designar-se por *Neonectria radicola* (Gerlach & Nilsson) Mantrini & Samuels.

O género *Neonectria* Wollenweber pertence à família *Hypocreaceae*, à ordem *Hypocreales*, à divisão *Ascomycota* e ao reino Fungi (Hawksworth *et al.*, 1995).

O fungo *C. obtusisporum* foi descrito pela primeira vez por Cooke & Harkness (1884) como *Fusarium obtusisporum*. A designação actual deve-se a Wollenweber (1926) que o reclassificou como *C. obtusisporum* (Cooke & Harkness) Wollenw.

Ainda em relação a *C. obtusisporum*, Booth (1966) e Brayford (1987) designaram a espécie *Nectria tawa* como seu teleomorfo. No entanto, pouco tempo depois, Samuels & Brayford (1990) colocaram em dúvida esta atribuição, referindo que os seus fundamentos não tinham sido discutidos, nem tinham sido efectuados estudos a partir de ascósporos. Estes autores analisaram as dimensões dos ascósporos de *N. tawa* e *Nectria coprosmae* Dingley e verificaram que eram similares e concordantes com as descritas para *N. radicola*, tendo concluído que as espécies *N. tawa* e *N. coprosmae* eram a mesma espécie e diferiam apenas nos respectivos anamorfos. Em resultado

do estudo realizado, propuseram um *stat. nov.* que designaram por *N. radicola* var. *coprosmae* (Dingley) Samuels & Brayford (Samuels & Brayford, 1990).

Seifert *et al.* (2003) analisaram *Neo. radicola* var. *coprosmae* e propuseram a sua passagem a um *taxon* superior, criando a espécie *Neonectria coprosmae* (Dingley) Seifert, *comb. nov.*, cujo anamorfo é *C. coprosmae* Booth. Em consequência destas modificações a nível taxonómico, presentemente, não está atribuído teleomorfo a *C. obtusisporum*, embora seja previsível que se trate de uma espécie do género *Neonectria*, uma vez que até à presente data, todos os fungos do género *Cylindrocarpon* têm como teleomorfos espécies daquele género (Mantiri *et al.*, 2001).

Num estudo taxonómico recente, uma espécie denominada *C. macrodidymum* Schroers, Hallen & Crous (anamorfo de *Neonectria macrodydima* Hallen, Schroers & Crous) foi associada à doença do pé negro da videira. Os isolados foram obtidos em videiras na África do Sul, Tasmania, Nova Zelândia e Canadá (Hallen *et al.* 2004). É possível que *C. macrodidymum* tenha sido anteriormente identificado em videira como *C. obtusisporum* (Cooke & Harkn.) Wollenw. (Grasso & Magnano di San Lio 1975, Scheck *et al.* 1998).

Mantirdi *et al.* (2001) e Brayford *et al.* (2004) transferiram representantes de todos os grupos do género *Nectria*, que possuem anamorfos *Cylindrocarpon*, para o género *Neonectria*. Através da análise de mtSSU (mitochondrial small subunit) e de sequências de DNA ribossomal (rDNA) de algumas das espécies, concluíram que as espécies de *Neonectria/Cylindrocapon* eram monofiléticas. No entanto, estes autores concluíram, também, que este grupo *Neonectria/Cylindrocarpon* incluía subgrupos distintos que correspondiam a pelo menos três dos quatro grupos delineados por Booth (1966).

Num estudo que incidia no fungo causador da podridão das raízes de ginseng (*Panax quinquefolius*), Seifert *et al.* (2003) encontraram variações moleculares significantes, particularmente em isolados do tipo *C. destructans*, sugerindo que *Neon. radicola/C. destructans* poderia apresentar-se como um complexo de espécies.

Recentemente, Halleen *et al.* (2006b) compararam isolados de *C. destructans* provenientes de videiras doentes em França, Portugal e África do Sul, com outros isolados do género *Cylindrocarpon*. Os resultados revelaram que os isolados provenientes de videiras, previamente identificados como *C. destructans* e *C. liriodendri*, possuíam características morfológicas e sequências da região ITS e de

parte do gene da β -tubulina idênticas. *C. liriodendri* foi inicialmente associado à podridão radicular do tulipeiro (*Liriodendron tulipifera*) (MacDonald & Butler, 1981).

Na Califórnia, Petit & Gubler (2007) chegaram a uma conclusão semelhante relativamente a isolados de *C. destructans* provenientes de videiras. *C. liriodendri*, foi posteriormente reportado em Espanha (Alaniz *et al.*, 2007) e na Austrália (Whitelaw-Weckert *et al.*, 2007).

Estudos desenvolvidos por Samuels & Brayford, 1990; Seifert *et al.*, 2003 indicaram que este taxon é na verdade um complexo e que, a espécie dominante nas vinhas sul-africanas é na realidade *C. liriodendri* (Halleen *et al.*, 2006) e não *C. destructans* como reportado anteriormente (Halleen *et al.*, 2004).

A espécie *C. pauciseptatum* é descrita como possuindo macroconídios predominantemente com três septos, direitos e com até 10 μ m de largura, com microconídios sub-globulosos a ovais e clamidósporos, (Schroers *et al.*, 2008). *C. pauciseptatum* e *C. macrodydimum* são monofiléticos e estão próximos de outras espécies de *Cylindrocarpon sensu stricto*, incluindo membros do complexo *C. destructans* (teleomorfo: *Neonectria radicola*) que inclui as espécies *C. liriodendri* (teleomorfo: *Neonectria liriodendri*), *C. destructans* var. *crassum* e *C. austrodestructans* (teleomorfo: *Neonectria austroradicicola* comb. nov.) (Schroers *et al.*, 2008). *C. pauciseptatum* é o taxon filogeneticamente mais próximo de *C. macrodydimum* e ambas as espécies estão muito próximas do complexo *C. destructans* (Seifert *et al.*, 2003).

Schroers *et al.* (2008) não conseguiram obter peritecas ao cruzarem isolados de *C. pauciseptatum* em meio gelosado contendo folhas de craveiro e agulhas de pinheiro. Também ainda não foram encontradas na natureza. Sendo assim, neste momento, não existe nenhum teleomorfo associado ao anamorfo *C. pauciseptatum*.

1.3.2. Características morfoculturais

1.3.2.1 Estados anamórficos e estados teleomórficos

Teleomorfo: *Neonectria radicola* (Gerlach & Nilsson) Mantrini & Samuels;
anamorfo: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten

- ***Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten**

Em gelose de batata dextrosada (PDA), as culturas de *C. destructans*, após 7 dias de crescimento, atingem 10 – 12mm de diâmetro (Booth, 1966), ou após 10 dias à

temperatura de 20°C, na obscuridade, 30 – 70mm de diâmetro (Samuels & Brayford, 1990). O micélio apresenta-se inicialmente branco acinzentado, tornando-se posteriormente castanho claro e, mais tarde vermelho acastanhado. O aspecto cultural é feltroso, cottonoso ou floconoso, com densidade média. A face inferior da colônia, é geralmente bege, tornando-se posteriormente vermelha acastanhada. O crescimento é regular e o aspecto à transparência é uniforme (Booth, 1966; Samuels & Brayford, 1990; Rego, 1994). As culturas degeneradas produzem tufo de micélio aéreo, não pigmentado e não esporulante ou, ocasionalmente, continuam a esporular, perdendo a pigmentação (Samuels & Brayford, 1990).

As hifas jovens são filamentosas, irregularmente septadas, possuem parede simples, conteúdo plasmático homogêneo e medem cerca de 3 µm de diâmetro. Na maturidade, atingem cerca de 6 µm de diâmetro, apresentam-se regularmente septadas, têm parede celular dupla e constrições junto dos septos. No seu interior pode observar-se numerosos vacúolos de cor amarelo palha; assumem um aspecto quase toruloso (Govi, 1952; Zazzerini & Marte, 1976).

Os conidióforos erguem-se abundantemente, a partir do micélio aéreo e da superfície do meio gelosado, são simples ou ramificados e terminam num ou mais fialides. Depois do desprendimento do primeiro conídio apresentam um “collarete” periclinal (Govi, 1952; Zazzerini & Marte, 1976; Samuels & Brayford, 1990). Os macroconidióforos formam-se a partir de ramificações laterais, possuem hastes alongadas, atingem cerca de 22,0 - 35,0 x 3,5 - 4,5 µm e, cada ramificação termina em um ou vários fialides. Os microconídios desenvolvem-se como fialides laterais ou terminais, medem cerca de 18,0 – 35,0 x 2,5 – 3,0 µm, são cilíndricos a subulados, podendo formar uma ou várias ramificações laterais (Booth, 1966, Rego, 2004).

Os microconídios são hialinos, de forma oval ou elíptica, com zero a um septo, formam-se na extremidade de fialides laterais ou terminais, reunindo-se em massas mucilaginosas, ou “falsas cabeças” (Samuels & Brayford, 1990; Rego, 1994; Sanchez-Hernández *et al.*, 1998b; Larignon, 1999, Rego, 2004).

Os macroconídios formam-se em esporodóquios, são hialinos, cilíndricos com as extremidades arredondadas, direitos ou curvos, adelgaçando ligeiramente para a base, com um a cinco septos (maioritariamente três), podendo apresentar até sete septos. Em cultura jovem são frequentemente tri-septados enquanto que em culturas velhas são uni-septados (Samuels & Brayford, 1990; Rego, 1994; Sánchez – Hernández *et al.*, 1998b, Rego, 2004).

No Quadro 1.1 apresentam-se as características biométricas dos micro e macroconídios de *C. destructans*, referidas por alguns autores.

Quadro 1.1. Características biométricas dos conídios de *Cylindrocarpon destructans* de acordo com diferentes autores

Autores	Microconídios (µm)	Macroconídios
Govi, 1952 ⁽¹⁾	(0 septos) 7,0-21,0 x 2,0-7,0	(1 septo) 14,0-28,0 x 2,0-7,0 (2-3 septos) 28,0-32,0 x 7,0-8,0
Booth, 1966 ⁽²⁾	(0-1 septos) 6,0-10,0 x 3,5-4,0	(1 septo) 20,0-30,0 x 5,0-6,0 (2-3 septos) 30,0-40,0 x 5,0-6,5 (4-5 septos) 45,0-52,0 x 6,5-7,5
Zazzerini & Marte, 1976 ⁽²⁾	(0 septos) 8,0-10,0 x 3,0-4,0	(1 septo) 18,0-24,0 x 4,0-5,0 (2 septos) 35,0-42,0 x 5,0-6,0 (3-4 septos) 40,0-50,0 x 3,0-6,5
Samuels & Brayford, 1990 ⁽³⁾	(0-1 septos) 4,0-13,0 x 4,0-6,0	(3 septos) (25-)29,4-36,3(-46) x (4-)5-7,5(8)
Rego, 1994 ⁽²⁾	(0-1 septos) 6,0-12,0 x 3,5-4,0	(1-3 septos) 35,0-54,0 x 6,5-7,5
Sánchez Hernández <i>et al.</i> , 1998b ⁽⁴⁾	(0-1 septos) 7,5 x 4,0	(1-3 septos) 25,0-38,0 x 5,0
Larignon, 1999 ⁽⁵⁾	(0 septos) 6,0-10,0 x 3,5	(1-5 septos) 20,0-52,0 x 5,0 – 7,0

Meio de cultura utilizado: (1) Czapek Agar; (2) PDA (Gelose de Batata Dextrosada); (3) PDA para os conídios com zero e um septo e PSA (Potato Sucrose Agar) ou SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) para os conídios com 3 septos; (4) PDA e CLA (Gelose de Folha de Craveiro) e (5) não mencionado

Os clamidósporos formam-se nas ramificações laterais ou em macroconídios (em culturas com mais idade); podem ser uni ou pluricelulares, intercalares ou terminais, surgindo isolados, em cadeia ou em aglomerados irregulares. São abundantes em culturas adultas, globosos, têm parede espessa, inicialmente hialinos, tornando-se depois castanhos (Govi, 1952; Booth, 1966; Ylimäki, 1967; Zazzerini & Marte, 1976; Samuels & Brayford, 1990; Rego, 2004).

• ***Neonectria radiculicola* (Gerlach & Nilsson) Mantrini & Samuels**

As peritecas de *Neonectria radiculicola* apresentam-se isoladas a densamente agregadas, geralmente aparecendo na periferia de pequenos cancrios no hospedeiro; são superficiais, não estromáticas (ou estroma reduzido). A sua forma é geralmente piriforme a sub-globosa, têm cor vermelha a vermelha acastanhada, são lisas ou verrugosas e não papiladas (ou com pequena papila cônica) (Booth, 1967; Samuels & Brayford, 1990; Larignon, 1999).

Os ascos são cilíndricos a sub-clavados, parafisados, contém oito ou mais ascósporos, raramente quatro a seis (Booth, 1967; Samuels & Brayford). Os ascósporos são elipsóides a subfusóides, hialinos, uniseptados, sem constrição no septo, lisos, raramente equinulados, parcial ou completamente bisseriados (Booth, 1967; Samuels & Brayford, 1990; Larignon, 1999).

No Quadro 1.2 apresentam-se as características biométricas de *Neonectria radicola* referidas por alguns autores.

Quadro 1.2. Características biométricas de *Neonectria radicola* de acordo com diferentes autores

Autores	Periteca (µm)	Ascós (µm)	Ascósporos (µm)
Gerlach & Nilsson, 1963			8,0-13,0 x 2,2-4,4
Booth, 1967 ⁽¹⁾	170,0-350,0 x 150,0-320,0	53,0-83,0 x 4,5-10,0	10,0-13,0 x 3,0-3,5
Samuels & Brayford, 1990 ⁽²⁾	175,0-350,0 x 130,0-220,0	40,0-60,0 x 7,0-8,0	(6,0-) 10,0-13,0 (-17,0) x (2,0-) 3,0-5,0 (-7,0)
Larignon, 1999 ⁽³⁾	170,0-350,0 x 150,0-321,0		10,0-13,0 x 3,0-3,5
Rego <i>et al.</i> , 2003 ⁽⁴⁾	150,8-220,4 x 133,4-203,0		

Meio de cultura ou hospedeiro: (1) PDA (Potato Dextros Agar); (2) CMD (Commeal Dextrose Agar); (3) Hospedeiro; (4) CLA (Carnation Leaf Agar)

Teleomorfo: *Neonectria liriodendri* Halleen, Rego & Crous;

anamorfo: *Cylindrocarpon liriodendri* MacDon. & Butler

- ***Cylindrocarpon liriodendri* MacDon. & Butler**

Em PDA as colónias apresentam cor de canela ou sépia, com escasso micélio aéreo. A temperatura mínima de crescimento é <4°C e a temperatura óptima é entre 20-25°C. À temperatura óptima, as culturas atingem 30-42 mm de diâmetro após 7 dias de crescimento na obscuridade. A temperatura máxima de crescimento é entre 30-35°C (Halleen *et al.*, 2006). As colónias normalmente apresentam micélio aéreo flocoso a feltroso.

Conidióforos simples ou complexos formados em esporodóquios. Conidióforos simples erguendo-se lateral ou terminalmente a partir do micélio aéreo, solitários ou com agregação fraca, escassamente ramificados ou não ramificados, possuem entre um e seis septos raramente constituídos apenas pela fialide com 40-160 µm de comprimento. Fialides monofialídicas, cilíndricas, 20-40 x 3-4 µm, 2-2,5 µm de diâmetro na zona apical. Nos esporodóquios, os conidióforos estão agregados em “pionnotes”, com ramificação irregular. Fialides cilíndricos, mais largos perto da base, 15-30 x 2,5-3,5 µm, 2-2,5 µm de largura perto da abertura (Halleen *et al.*, 2006)

Micro e macroconídios presentes em ambos os tipos de conidióforos. Os macroconídios são predominantemente formados pelos dois tipos de conidióforos, normalmente com 1-3 septos, direitos ou por vezes apresentado uma ligeira curvatura, cilíndricos, e maioritariamente com um hilo visível, basal, ou ligeiramente deslocado lateralmente (Halleen *et al.*, 2006).

Microconídios produzidos escassamente em todos os meios, normalmente com 0-1 septo, elipsoidais, cilíndricos ou ovais, mais ou menos direitos, com um hilo lateral. Os microconídios ovais (0 septos) formam-se predominantemente em conidióforos, densos e penicilados, em meio de CLA. Noutros meios de cultura, normalmente verifica-se uma mistura dos três tipos de microconídios. Os conídios formam-se em “falsas cabeças”, em conidióforos simples ou como massas hialinas em conidióforos simples e complexos.

No Quadro 1.3 apresentam-se as características biométricas dos micro e macroconídios de *C. liriodendri*, referidas por alguns autores.

Quadro 1.3. Características biométricas dos conídios de *Cylindrocarpon liriodendri* de acordo com diferentes autores.

Autores	Microconídios (µm)	Macroconídios (µm)
Halleen <i>et al.</i> (2006) ⁽¹⁾	(0 septos) ⁽¹⁾ 5-15 x 2,5-4 (0 septos) ⁽²⁾ 3-5 x 3-4	(1-3 septos) (24-)35-40(-55) x (4,5-)5,5-6(-6,5)
Alaniz <i>et al.</i> (2007) ⁽²⁾		(1 septo) (11,6) 16,1 (21,6) x (3,7) 4,4 (5,0) (2 septos) (21,5) 23,4 (25,6) x (4,8) 5,0 (5,3) (3 septos) (24,6) 27,5 (29,7) x (5,0) 5,3 (5,6)

Meio de cultura utilizado: (1) PDA e CLA (Gelose de Folha de Craveiro); (2) PDA (Gelose de Batata Dextrosada)
(1): forma elipsoidal a subcilíndrica; (2): forma ovóide

Os clamidósporos surgem intercalares ou terminais no micélio, isolados e ocasionalmente em cadeias (Alaniz *et al.*, 2007). Apresentam cor acastanhada, ovais a elipsoidais, em curtas cadeias intercalares, com dimensões de aproximadamente 10-20 x 10 - 17 µm.

- ***Neonectria liriodendri* Halleen, Rego & Crous**

O teleomorfo de *C. liriodendri* é actualmente designado por *Neonectria liriodendri* (Halleen *et al.*, 2006).

As peritecas (não conhecidas na natureza), formadas heterotalicamente *in vitro*, apresentam-se isoladas ou em grupos até seis e desenvolvem-se na superfície do agar ou em pedaços esterilizados de madeira de *Fagus* ou em folha de pinheiro. As peritecas são ovais a piriformes, têm cor laranja a vermelho, lisas a verrugosas, podendo ter até 70 µm de largura e até 300 µm de diâmetro e altura. Apresentam estroma vermelho escuro constituído por células pseudoparênquimatosas (Halleen *et al.*, 2006).

Os ascos são sub-clavados a cilíndricos, com 45 – 60 µm de comprimento e 5 – 6 µm de largura, contendo oitos ascósporos. Ascósporos unisseptados, elipsoidais a oblongos, lisos (por vezes algo verrugosos), hialino, tornando-se castanho claro com a idade (Halleen *et al.*, 2006).

Segundo Halleen *et al.* (2006), as características biométricas dos ascósporos são as seguintes: (7-)9-11(-14) x (2,5-)3-3,5(-4) μm .

Teleomorfo: *Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers & Crous;
anamorfo: *Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous

- ***Cylindrocarpon macrodidymum* Schroers, Halleen & Crous**

Em PDA, as colónias atingem 30-45 mm de diâmetro ao fim de 7 dias, na obscuridade, à temperatura óptima de 25 °C. As colónias, a 20 °C atingem 10-20 mm de diâmetro em SNA e 10-17 mm de diâmetro em PDA, no final de 4 dias. Passados 7 dias as mesmas colónias podem atingir 30-45 mm de diâmetro em SNA e 25-35 mm em PDA (Halleen *et al.*, 2004).

Em SNA, o micélio aéreo apenas se desenvolve perto ou na superfície de um papel de filtro, difuso, consistindo de uma hifa apresenta cor branca, ou amarelada quando se acumula no papel de filtro. Em PDA, o micélio aéreo forma-se abundantemente cobrindo toda a colónia ou sectores conferindo-lhe uma aparência feltrosa. Em PDA, apresenta cor predominantemente amarelada e em OA (“oat meal agar”) uma cor branca amarelada. O verso da colónia em SNA não apresenta pigmentação, em OA tem cor castanho-mostarda a castanho-canela ou cor de mel, por vezes pode também apresentar um tom amarelo pálido a amarelo mostarda nas margens. Em PDA, na parte central da colónia a cor é castanho avermelhado, e mais próximo da margem apresenta cor laranja escuro, vermelho dourado ou amarelo acastanhado, tipicamente apresenta margens de cor amarelo pálido a âmbar (Halleen *et al.*, 2004).

Tem conidióforos simples ou complexos, esporodoquiais. Os conidióforos simples erguem-se lateral ou terminalmente do micélio aéreo, ou a partir da superfície do agar. Solitários ou em pequenos agregados, não ramificados, com 1-4 septos, raramente constituídos apenas pela fialide, com 55-120 μm de comprimento. Fialides monofialídicas, cilíndricas afunilando levemente para a base, com 16,5-30 μm de comprimento, 2,5-3,5 μm de largura na base e 2-2,5 μm perto da zona apical (Halleen *et al.*, 2004).

Conidióforos dos esporodóquios complexos, agregados em “pionnotes” esporodoquiais, com ramificação irregular. Fialides cilíndricas afunilando na ponta, normalmente com o ponto mais largo próximo do centro, (15,5-)17,5 - 20-21(-28,5) μm

de comprimento, (2,5-)3(-3,5) μm de largura na base, (2,5-)3,5(-4) no ponto mais largo e (1,5-)2(-2,5) perto da abertura (Halleen *et al.*, 2004).

Micro e macro conídios presentes em ambos os tipos de conidióforos. Macroconídios predominantemente formados pelos dois tipos de conidióforos, normalmente com 1-3(4-) septos, direitos, por vezes com uma ligeira curvatura, cilíndricos, tipicamente alargando na ponta, apresentando-se por isso com aspecto clavado, particularmente quando ainda se encontra ligado à fialide. A célula apical está tipicamente “dobrada” para um dos lados, com um hilo disposto de forma ligeiramente lateral (Halleen *et al.*, 2004).

Os microconídios são raros em SNA, e moderadamente comuns em OA, com um ou nenhum septo, elipsoidais ou ovais, mais ou menos direitos, com um hilo disposto lateralmente (Halleen *et al.*, 2004).

Os conídios formam-se em “falsas cabeças”, em conidióforos simples ou como massas brancas (OA) ou sem pigmentação (SNA) em conidióforos complexos (Halleen *et al.*, 2004).

No Quadro 1.4 apresentam-se as características biométricas dos micro e macroconídios de *C. macrodidymum*, referidas por alguns autores.

Quadro 1.4. Características biométricas dos conídios de *Cylindrocarpon macrodidymum* de acordo com diferentes autores

Autores	Microconídios (μm)	Macroconídios (μm)
Halleen <i>et al.</i> (2004)⁽¹⁾	(0 septos) (5,5-)8-9,5-10,5(-12,5) x (3,5-)4(-4,5)	(1 septo) 24-32 x 5-7 (3 septos) (26-)34-36-38(-45) x (4-)5,5-6-6,5(-8)
Alaniz <i>et al.</i> (2007)⁽²⁾	(N/A)	(1 septo) (12,7) 18,6 (26,9) x (3,8) 4,6 (5,3) (2 septos) (27,2) 30,5 (33,7) x (5,0) 5,4 (5,7) (3 septos) (33,1) 35,9 (39,0) x (5,0) 5,8 (6,2)

Meio de cultura utilizado: (1) SNA e OA; (2) PDA (Gelose de Batata Dextrosada)

Por vezes dá-se a formação de clamidósporos, principalmente em curtas cadeias intercalares, com as seguintes dimensões: 7-12,5 x 6-10 μm (Halleen *et al.*, 2004).

- ***Neonectria macrodidyma* Halleen, Schroers & Crous**

Peritecas solitárias ou em grupos, desenvolvendo-se directamente à superfície do agar, ou na superfície da folha de craveiro em CLA. Têm forma ovóide, a piriforme, cor vermelho escuro, lisas ou com uma leve rugosidade. Têm 200-250 μm de diâmetro e com até 270-300 μm de altura. Não possuem um estroma visível e a parede é constituída por duas camadas difíceis de distinguir. Uma região externa composta por 1 a 3 camadas de células angulares subglobosas, 9-20 x 7-15 μm . A região mais

interna tem cerca de 5 µm de espessura. Por vezes, as paredes das regiões externa e interna, tornam-se mais finas localmente formando um pseudoporo em conjugação com estruturas idênticas em células adjacentes. As verrugas das peritecas são constituídas por células globosas a subglobosas com medidas de 7-16,5 x 4,5-13,5 µm, com paredes até 2,5 µm de espessura. Ascósporos clavados, com 65 x 10 µm contendo oito esporos. Ascósporos divididos em duas células de tamanho idêntico, elipsoidais, a elipsoidais oblongas, alargando na extremidade, lisos a pouco rugosos, (12-)14-15-16(-18) x (3,5-)4(-4,5) µm.

Anamorfo: *Cylindrocarpon pauciseptatum* Schroers & Crous

- ***Cylindrocarpon pauciseptatum* Schroers & Crous**

Em PDA, as colónias atingem 35 - 50 mm de diâmetro ao fim de 7 dias na obscuridade, à temperatura óptima de 25°C. À temperatura de 30°C as colónias atingem 10 – 15 mm de crescimento, ao fim de 14 dias na obscuridade.

Em PDA, as colónias apresentam-se brancas a castanho acinzentado, com aspecto feltroso devido ao micélio aéreo ou, cor-de-laranja a acastanhadas em sectores sem crescimento de micélio aéreo. O verso da colónia têm cor amarela acastanhada a castanho, tipicamente com margem de cor amarela claro, ou âmbar (Schroers *et al.*, 2008).

Os conidióforos formam macroconídios simples, complexos ou esporodóquias. Possui conidióforos simples erguendo-se lateral ou terminalmente a partir do micélio aéreo, solitários, sem ramificações ou pouco ramificados, sendo constituídos apenas por fialides. Fialides monofialídicas, mais ou menos cilíndricas, curvando ligeiramente na parte superior, 11,5 – 18,5 µm de comprimento, 2,5 – 4,0 µm de largura na base, 3,0 – 4,5 µm no ponto mais largo e 2,5 – 3,5 µm perto da zona apical. Os conidióforos são complexos, agregados em pequenos esporodóquios e ramificados irregularmente (Schroers *et al.*, 2008).

Em meio SNA, formam-se conidióforos e microconídios em culturas com 5 semanas. Surgem á superfície do meio, simples com um aglomerado terminal de fialides, normalmente com 9 – 12 µm de comprimento, 2 – 3 µm de largura na base, 2,5 – 4 µm no ponto mais largo e 1 – 2 µm perto da abertura.

Em meio SNA e PCA, os macroconídios formam-se em massas lisas, predominantemente com 3 septos (raramente com 1, 2 ou 4 septos), direitos ou

ligeiramente curvados, mais ou menos cilíndricos, com ambas as extremidades arredondadas e normalmente sem hilo visível. Macroconídios com 3 septos com dimensões (37-) 42-45-47(-54) x (7,0-)8,5-9,0-9,5(-10,0) µm.

Microconídios com 0 septos, com forma oval, raramente elipsoidal, com um hilo central, ou ligeiramente deslocado para um dos lados, visível. Microconídios (0 septos) com dimensões (3,5-)4,4-5-5,4(-7,8) x (2,4-)2,9-3,3-3,7(-4,6) µm.

Os clamidósporos são, normalmente, de cor amarela dourada com formação intercalar ou em agregados. São globosos ou elipsoidais com 8-15 x 7-14 µm (Schroers *et al.*, 2008).

1.4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ESCALA DE HOSPEDEIROS

O género *Cylindrocarpon* tem uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo em vários continentes e “habitats”, desde florestas tropicais húmidas até aos solos da tundra ártica.

Apresenta-se a lista de países onde as diferentes espécies foram assinaladas e os autores que as descreveram (Quadro1.5).

Quadro 1.5. Lista dos países onde *Cylindrocarpon* spp. foram assinaladas, autores que as descreveram e designação da espécie(s)

País	Autores	Espécie
Austrália	Taylor, 1956	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
	Whitelaw-Weckert <i>et al.</i> , 2007	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
	Halleen <i>et al.</i> , 2004	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
África do Sul	Fourie & Halleen, 2001; Fourie <i>et al.</i> , 2000)	<i>Cylindrocarpon</i> spp.
	Halleen <i>et al.</i> , 2004	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
		<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
	Halleen <i>et al.</i> , 2006b	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
Argentina	Gatica <i>et al.</i> , 2001	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
Alemanha	Fisher & Kassemeyer, 2003	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
Brasil	Garrido <i>et al.</i> , 2004	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
Canadá	Halleen <i>et al.</i> , 2004	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
Chile	Auger <i>et al.</i> , 1999	<i>Cylindrocarpon</i> spp.
	Auger <i>et al.</i> , 2007	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
Espanha	Armengol <i>et al.</i> , 2001	<i>Cylindrocarpon</i> spp.
	Alaniz <i>et al.</i> , 2007	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
	Alaniz <i>et al.</i> , 2007	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>

Quadro 1.6. Lista dos países onde *Cylindrocarpon* spp. foram assinaladas, autores que as descreveram e designação da espécie(s) (continuação)

País	Autores	Espécie
E.U.A.	Scheck <i>et al.</i> , 1998a, 1998b	<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>
	Gugino & Travis, 2003	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
	Petit & Gubler, 2005	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
	Petit & Gubler, 2007	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
Eslovénia	Schroers <i>et al.</i> , 2008	<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>
França	Maluta & Larignon, 1991; Larignon, 1999	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
	Halleen <i>et al.</i> , 2006b	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
Grécia	Fourie & Halleen, 2001; Fourie <i>et al.</i> , 2000)	<i>Cylindrocarpon</i> spp.
Irão	Mohammadi <i>et al.</i> , 2009	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
Itália	Grasso & Magnano di San Lio, 1975	<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>
Líbano	Choueiri <i>et al.</i> , 2009	<i>Cylindrocarpon</i> spp.
Nova Zelândia	Halleen <i>et al.</i> , 2004	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
		<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
	Halleen <i>et al.</i> , 2006b	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
	Schroers <i>et al.</i> , 2008	<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>
Portugal	Rego, 1994	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
	Rego <i>et al.</i> , 2005	<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
	Halleen <i>et al.</i> , 2006b	<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
Rússia	Mil'ko, 1959	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
Tasmania	Sweetingham, 1983	<i>Cylindrocarpon destructans</i>
Uruguai	Abreo <i>et al.</i> (2010)	<i>Cylindrocarpon destructans</i> var <i>crassum</i>
		<i>Cylindrocarpon liriodendri</i>
		<i>Cylindrocarpon macrodidymum</i>
		<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i>
		<i>Cylindrocarpon olidum</i> var <i>crassum</i>

1.5. SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA EM VITIS SPP.

A doença designada por pé-negro da videira tornou-se uma das mais relevantes doenças do lenho da videira, afectando viveiros e vinhas jovens em todo o mundo (Rego *et al.*, 2000; Petit & Gubler, 2005; Halleen *et al.*, 2006a; Alaniz *et al.*, 2007). *Cylindrocarpon* spp. infectam a videira através das raízes e da zona basal do porta-enxerto, causando necroses nas raízes, na porção basal do porta-enxerto e a redução da biomassa radicular (Halleen *et al.*, 2003). A remoção do ritidoma do porta-enxerto revela uma coloração negra e necrose dos tecidos da madeira, que se desenvolve a partir da base do porta-enxerto. Outros sintomas incluem redução do vigor, entrenós curtos, pouca folhagem, folhas pequenas que apresentam cloroses e necroses, e que frequentemente levam à morte da planta (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975;

Grasso, 1984; Maluta and Larignon, 1991; Scheck *et al.*, 1998; Rego *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2006a) (Figura 1.1).

Durante a Primavera, as plantas afectadas evidenciam ausência de abrolhamento, atraso nos estados fenológicos, revelado pelo abrolhamento tardio com pouca vegetação que frequentemente murcha no início do Verão (Larignon, 1999; Fourie *et al.*, 2000).

As plantas afectadas por pé-negro emitem, com frequência, novas raízes num nível superior do porta-enxerto, que vão permitir a vegetação da planta, durante um determinado período de tempo (Scheck *et al.*, 1998b; Dubos, 1999; Dumot *et al.*, 1999; Larignon, 1999). Em videiras com mais idade, o diâmetro do porta-enxerto abaixo desta segunda coroa de raízes pode ser menor (Fourie & Halleen, 2001a).

Sob o ritidoma do porta-enxerto doente, pode observar-se o desenvolvimento de uma necrose acastanhada na região basal da planta, típica da doença. Esta necrose, de dimensões variáveis, pode estender-se ao longo de todo o porta-enxerto, atingindo a região da enxertia. Cortes transversais, efectuados ao longo da planta, permitem detectar a existência de necroses nos tecidos corticais (tipo pontuações ou anel contínuo), na base do porta-enxerto e na zona de enxertia. Ao longo do sistema vascular, ocorre a formação de tiloses (Galet, 1995; Dubos, 1999; Rego, 2004).

Nos viveiros vitícolas, durante o período de enraizamento das estacas, normalmente não se observam sintomas na parte aérea da planta (Rego *et al.*, 2001b; Halleen *et al.*, 2003). No entanto, é visível um elevado número de plantas mortas que terão sucumbido no início do processo de enraizamento. Fungos do género *Cylindrocarpon* são isolados com frequência, a partir de raízes dessas plantas (H. Oliveira, comunicação pessoal).

Os sintomas causados por *Cylindrocarpon* spp. em *Vitis* spp. são muito semelhantes aos originados por espécies do género *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M. J. Wingf e por *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M. J. Wingf & Mugnai) Crous & W. Gams, fungos responsáveis pela doença de Petri. Devido a este facto, o diagnóstico do pé-negro não deve ser efectuado apenas com base nos sintomas visíveis, quer na vegetação quer no lenho da videira (Scheck *et al.*, 1998b; Fourie & Halleen, 2001; Rego *et al.*, 2001b).



Figura 1.1. Sintomas associados ao pé negro da videira: a) declínio e morte de porta-enxertos em vinha após a plantação; b) vegetação reduzida e clorótica; c) avermelhamento das folhas; d) corte longitudinal da base de porta-enxerto infectado; e) corte longitudinal da zona da enxertia com necroses no lenho.

1.6. BIOECOLOGIA E BIOLOGIA

As espécies de *Cylindrocarpon* habitam o solo, ocorrendo como saprófitas em detritos vegetais, ou como patogénicas, infectando vários hospedeiros, a partir de feridas em raízes e caules (Brayford, 1993). Estes fungos apresentam um comportamento de “parasitas de equilíbrio”, ou ainda de “parasitas oportunistas”, que podem provocar doença quando certas condições estão reunidas, nomeadamente a receptividade das plantas. De entre os factores que favorecem a receptividade das plantas, os mais frequentemente referidos são as feridas causadas no viveiro (preparação de estacas, enxertia), no armazenamento e transporte, na plantação e condução da vinha (enxertia, podas). Também a presença de patogénios colonizadores do lenho e as condições adversas a que ficam sujeitas as plantas em situações de replantação são factores a considerar (Larignon & Dubos, 1997; Pascoe, 1998; Dumot *et al.*, 1999; Rumbos, 2003; Martinez *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004)

Nos viveiros vitícolas, as principais contaminações das plantas por *Cylindrocarpon* spp. ocorrem a partir de inóculo existente no solo. Este facto foi comprovado por Rego *et al.* (2001a) que verificaram que na altura da plantação (Outubro), a percentagem de plantas infectadas era muito reduzida; em Junho, após o enraizamento, a incidência de *Cylindrocarpon* spp. era de 37%, em viveiros nacionais localizados na região do Oeste. Na África do Sul, Halleen & Crous (2001) constataram, em condições análogas, 50% de plantas infectadas.

O material de propagação vegetativa (porta-enxertos e enxertos prontos) tem também sido amplamente citado como importante veículo de disseminação do patogénio (Rego *et al.*, 2001a; Fourie & Halleen, 2003; Gubler *et al.*, 2004), o que explica a distribuição aleatória das plantas contaminadas com o fungo nas parcelas da vinha (Rego, 2004).

O ciclo biológico de *Cylindrocarpon* spp. não é totalmente conhecido sobre a videira, pois existem teleomorfos das espécies responsáveis pelo pé-negro na referida cultura que nunca foram observados *in vivo* (nem *in vitro*). Mesmo para as espécies em que se observou a formação de peritecas, desconhece-se o papel dos ascósporos no ciclo da doença.

Admite-se que o fungo penetre pelas raízes, ou pela base do porta-enxerto, a partir de feridas e progrida de forma relativamente rápida nos tecidos do hospedeiro provocando a necrose característica de cor castanha a negra (Dubos, 1999; Rego *et al.*, 2000; Gubler *et al.*, 2004).

1.7. FACTORES CONDICIONANTES DA DOENÇA

Dos factores ambientais que mais influenciam o desenvolvimento do pé-negro da videira destacam-se a temperatura, a intensidade luminosa e as características físicas e químicas do solo (Brayford, 1993).

Factores ambientais que induzam stresse no hospedeiro, como deficiência em nutrientes, má drenagem do solo, compactação do solo, elevada carga em plantas jovens, plantação de videiras em solo mal preparado e plantação mal conduzida, desempenham um papel importante na severidade da doença do pé-negro (Larignon, 1999; Fourie *et al.*, 2000; Fourie & Halleen, 2001b; Halleen *et al.*, 2004).

A compactação do solo e/ou má preparação do solo contribuem para o mau desenvolvimento das raízes (Fourie *et al.*, 2000; Halleen *et al.*, 2004). As altas temperaturas durante o período do Verão também desempenham um papel importante na expressão dos sintomas, uma vez que os sistemas radicular e vascular das plantas doentes se encontram comprometidos, e não conseguem fornecer água suficiente para compensar as elevadas taxas de evapotranspiração durante os períodos com temperaturas mais altas (Larignon, 1999).

Em 1958, Peterson estudou a influência do tipo de solo na população de fungos da rizosfera de plantas de trevo vermelho e trigo e verificou que existia uma diferença notável quanto à proporção de *Fusarium* spp. e de *Cylindrocarpon* spp. entre os solos arenosos ácidos e os solo calcários alcalinos. Nos solos ácidos, verificou que havia predominância de espécies de *Fusarium* spp. na superfície das raízes, enquanto que as espécies de *Cylindrocarpon* estavam praticamente ausentes. Nos solos calcários alcalinos as espécies de *Cylindrocarpon* eram predominantes e as de *Fusarium* eram raras. Em solos argilosos e neutros, os fungos encontravam-se em proporção idêntica.

1.8. MEIOS DE LUTA

Actualmente os problemas de declínio e morte das videiras jovens são atribuídos a um conjunto de doenças, causadas por um complexo de fungos: *Cylindrocarpon* spp., responsável pelo pé-negro; *Phaelmoniella chlamydospora*, responsável pela doença de Petri e várias espécies de *Phaeoacremonium* (Mugnai *et al.*, 1999; Pascoe & Cottral, 2000; Groenewald *et al.*, 2001, Hallen *et al.*, 2006). No entanto, estes problemas podem ser, também, resultantes de más práticas agrícolas. O combate a estas doenças, particularmente no que respeita ao pé-negro da videira, exige

fundamentalmente a adopção de práticas culturais com carácter preventivo (Rego, 1994; Dubos, 1999; Larignon, 1999; Martínéz *et al.*, 2004), dada a actual inexistência de meios de luta directos eficientes.

Na última década, foram efectuados estudos promissores no controlo da doença de Petri (Crous *et al.*, 2001; Fourie & Halleen, 2001; Jaspers, 2001; Laukart *et al.*, 2001; Rooney & Gubler, 2001; Fourie & Halleen, 2004a, 2004b, 2006a;) e no controlo do pé-negro da videira (Fourie & Halleen, 2001; Gubler *et al.*, 2004; Petit, 2005; Rego *et al.*, 2006a; Halleen *et al.*, 2007), em viveiros vitícolas, utilizando meios de luta químicos, biológicos e físicos. Recentemente foram também obtidos resultados promissores em laboratório e estufa, utilizando fungicidas convencionais e biopesticidas (Rego *et al.*, 2006a; Nascimento *et al.*, 2007). No entanto, em condições de campo, estas medidas não foram suficientemente promissoras para serem recomendadas para aplicações em larga escala (Halleen *et al.*, 2007).

1.8.1. Luta Cultural

O material de propagação vegetativa utilizado na instalação de novas vinhas deve ser isento e cuidadosamente observado de forma a serem detectadas possíveis contaminações. As contaminações ao nível dos porta-enxertos (bacelos ou bacelos – enxertados) podem ser observadas mediante a observação de anomalias ao nível do desenvolvimento das raízes, nomeadamente o seu desenvolvimento reduzido e enegrecimento, ou pontuações negras dispersas na região cortical que podem ser observadas na secção transversal do porta-enxerto (Cabral, 2002). Por amostragem, deve realizar-se um corte transversal na base do porta-enxerto e proceder à pesquisa de pontuações ou secções negras dispersas na região cortical do lenho (Rego, 1994). Todo o material suspeito deve ser analisado em laboratório (Rego, 2004).

As medidas culturais a utilizar devem permitir a criação de uma estrutura de solo favorável, a grande profundidade, de maneira a assegurar um bom funcionamento hídrico à planta.

Antes da plantação da vinha, é conveniente observar e avaliar o terreno para que a preparação do solo, a escolha do porta-enxerto, a interpretação das análises de solo e a orientação da vinha sejam as mais adequadas (Martínéz *et al.*, 2004).

O perfil do solo e a sua profundidade devem ser suficientes para que o sistema radicular se desenvolva livremente, de forma a assegurar o crescimento e desenvolvimento da planta. Deve revelar-se homogéneo, com boa drenagem e sem

compactação. É conveniente efectuar análise químicas e físicas do solo e, antes da instalação, proceder a uma adubação de fundo, com benefícios nas propriedades e na estrutura do solo (Martínez *et al.*, 2004).

Para evitar a disseminação dos fungos do género *Cylindrocarpon*, as operações culturais, como a poda, devem ser efectuadas em último lugar na(s) zona(s) contaminada(s), visto que estes podem estar presentes nos vasos xilémicos das videiras, assim como no solo. Desta forma, até mesmo as mobilizações do solo poderão contribuir para a disseminação dos patógenos. Assim, em vinhas afectadas pela doença, no combate a infestantes e sempre que possível, dever-se-á optar pelo uso de herbicidas (Rego, 1994).

Nas vinhas já instaladas, que demonstrem sintomas de pé-negro, as cepas infectadas deverão ser arrancadas e queimadas, tendo o cuidado de remover todo o sistema radicular, pois os fungos *Cylindrocarpon* spp. sobrevivem durante vários anos nas raízes dos seus hospedeiros (Rego, 1994).

A replantação de vinhas, logo após o arranque, tem sido prática corrente nos últimos anos. Nestes solos, ocupados anteriormente com vinha, o teor em certos elementos essenciais e em matéria orgânica encontra-se normalmente reduzido, enquanto outros elementos podem encontrar-se em excesso (fósforo, potássio e enxofre). Para além disto, a cultura instalada impede certas mobilizações culturais e conduz à compactação do solo na entrelinha e indirectamente reduz e altera a actividade microbiana no solo. As novas plantas podem vir a ser contaminadas por *Cylindrocarpon* spp. e outros patógenos do solo, que se mantêm viáveis durante vários anos nos restos de raízes e nas cepas. É por isso importante aguardar alguns anos para replantar a vinha e, durante esses anos, realizar mobilizações com vista a reduzir os restos das plantas da cultura anterior e fazer rotações com culturas anuais, o que contribui para a regeneração microbiológica e agronómica do solo (Martínez *et al.*, 2004).

1.8.2. Luta Química

Em 1993, Pujol efectuou estudos *in vitro* de forma a avaliar a eficácia de 39 substâncias activas pertencentes a 16 famílias químicas e de 14 misturas de fungicidas, no crescimento micelial e na germinação de esporos de *C. destructans*, tendo verificado que os produtos que proporcionavam os melhores resultados pertenciam a três famílias químicas: triazóis, carbamatos e imidazóis. Dentre estes, os

fungicidas que revelaram maior eficácia foram propiconazol, benomil, carbendazime, imazil e procloraz, tendo este último sido aquele que revelou melhor eficácia na inibição de crescimento micelial do fungo, não tendo, no entanto, inibido a germinação de esporos (Pujol, 1993).

Nos anos seguintes e, provavelmente, na sequência deste trabalho, Boubals (1994) e Galet (1995) recomendaram a imersão dos porta-enxertos numa solução de sulfato de cobre ou de procloraz a 500 mg L⁻¹, como medida preventiva.

As desinfecções do solo não representam uma solução viável no combate a *C. destructans* por não serem eficientes e por conduzirem a desequilíbrios microbiológicos do solo (Traquair, 1995; Martínéz *et al.*, 2004). Um ensaio de campo realizado por Rego *et al.* (2001a), em solo de viveiro de porta-enxertos, localizado na região do Ribatejo e Oeste, permitiu verificar que a aplicação de dazomete e metame-sódio apenas proporcionava uma ligeira diminuição do número de plantas atacadas, relativamente à testemunha, que não era, no entanto, significativa.

Mais recentemente, Rego *et al.* (2006a) conduziram ensaios de fungicidas *in vitro* tendo chegado à conclusão de que o procloraz, o benomil e as misturas ciprodinil + fludioxonil e carbendazime + flusilazol inibiam o crescimento micelial de *C. liriodendri* (na altura como *C. destructans* e que, por seu lado, o tebuconazol e difenoconazol não revelaram tanta eficácia. A mistura ciprodinil + fludioxonil, a azoxistrobina, a trifloxistrobina e a tolilfluanida reduziram a germinação de esporos (Rego *et al.*, 2006a). Resultados *in vivo*, conduzidos em videiras envasadas e pré-inoculadas, em Portugal, provaram que o benomil, o tebuconazol e as misturas carbendazime + flusilazol e ciprodinil + fludioxonil aumentaram significativamente o crescimento das plantas e diminuíram a incidência da doença (Rego *et al.*, 2006a).

Em viveiros, Fourie & Halleen (2004, 2006) demonstraram que ao imersão do material de propagação vegetativa em benomil ou uma formulação patenteada de “didecyldimethylammonium chloride” teve eficácia na limitação das infecções provocadas pela maioria dos patógenos responsáveis pelas doenças do lenho, na região basal e na região da enxertia em plantas de viveiro. No entanto, estes tratamentos não revelaram eficácia contra o pé-negro da videira provavelmente, devido ao facto da infecção por este patógenos ocorrer a partir dos solos dos viveiros (Halleen *et al.*, 2003).

Resultados *in vitro* obtidos por Halleen *et al.* (2007) revelaram que “prochloraz manganese chloride” e benomil foram eficazes na inibição do crescimento micelial de

Cylindrocarpon e *Campylocarpon*, enquanto que o fusilazol e o imazalil foram altamente eficazes contra *Cylindrocarpon* spp. Este foi o primeiro estudo *in vitro* efectuado para avaliar a sensibilidade a fungicidas de *C. macrodidymum*, *Campyl. fasciculare* e *Campyl. pseudofasciculare*, no qual os resultados apoiam os reportados para *C. liriodendri*/*C. destructans* por Rego *et al.* (2005) (Halleen *et al.*, 2007).

No estudo referido anteriormente (Halleen *et al.*, 2007) foi também testada a adição de “Nu-film 17” e “carnauba wax” ao benomil, com o intuito de prolongar a eficácia e a aderência do fungicida. Todavia, este tipo de formulações, baseadas em benomil e seus metabolitos, deixaram de ter qualquer interesse em numerosas regiões do mundo, designadamente na Europa e EUA, uma vez que por razões toxicológicas estes fungicidas foram banidos do mercado.

Rego *et al.* (2009) testaram os efeitos de quatro fungicidas, ciprodinil + fludioxonil, piraclostrobina + metirame, fludioxonil e ciprodinil, na incidência e severidade de fungos do lenho da videira, em viveiro vitícola, para plantas da casta Aragonez/1103 P. Os ensaios de campo foram instalados em dois solos de viveiro, com e sem historial de viveiro vitícola.

A mistura ciprodinil + fludioxonil reduziu significativamente tanto a incidência como a severidade de *Cylindrocarpon* spp. em condições de alta a muito alta pressão de inóculo. A mistura não erradicou os patogénios, mas reduziu a incidência e severidade dos mesmos em comparação com as testemunhas não tratadas (Rego *et al.*, 2009). Os resultados obtidos do tratamento com piraclostrobina + fludioxonil mostraram uma significativa redução da incidência e severidade de *Cylindrocarpon* spp. no campo com historial de viveiro, sendo no geral tão eficaz como a mistura ciprodinil + fludioxonil (Rego *et al.*, 2009). Este estudo demonstrou que alguns fungicidas reduziram a infecção e colonização das plantas de videira, antes e durante o enraizamento. Foi assim demonstrado que a imersão de estacas de videira em fungicida, antes da enxertia, representa uma alternativa ou complemento a outras estratégias de luta, actualmente em utilização (Rego *et al.*, 2009).

1.8.3. Luta biológica

No âmbito da luta biológica e no que respeita a fungos antagonistas, Fourie *et al.* (2001) estudaram o efeito de tratamentos com espécies do género *Trichoderma* na ocorrência de fungos nas raízes e a 6 cm da porção basal de porta-enxertos de videira, que se encontravam em viveiro. A comparação dos resultados obtidos entre os

tratamentos efectuados com *T. harzianum* e os resultantes do tratamento com quintozeno/procimidona (estando ambos proibidos em Portugal), permitiu verificar que a massa total de raízes formadas era superior nas videiras tratadas com o antagonista, e a percentagem de isolamento de *Cylindrocarpon* spp. era inferior. Apesar dos efeitos dos dois tratamentos não diferirem significativamente, Fourie *et al.* (2001) sugerem que a aplicação de *T. harzianum*, em viveiros vitícolas, proporciona plantas mais saudáveis e com menores níveis de infecção de *Cylindrocarpon* spp. e também de *Phaeomoniella/Phaeoacremonium*.

Halleen *et al.* (2007) estudaram também o efeito de *Trichoderma* em videira. No entanto, os tratamentos foram ineficientes pois apenas preveniram a infecção por *Phaeomoniella* por uma temporada. Anteriormente, estes tratamentos reduziram a incidência de *Cylindrocarpon* spp. em viveiro e aumentaram, significativamente, o crescimento radicular (Fourie *et al.*, 2001). Apesar destes resultados não terem sido observados em estudos subsequentes, o efeito estimulante no crescimento pode, possivelmente, fazer com que as plantas sejam mais resistentes a situações de stresse (Halleen *et al.*, 2007).

Laflamme *et al.* (1999) e Borges Jr. *et al.* (2000) estudaram a actividade de quitosana *in vitro* sobre diversos fungos. O produto induziu alterações na actividade metabólica de *C. destructans* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (agente da fusariose vascular do tomateiro). A quitosana (poli- β -1,4-D-glucosamina) é um polímero não-tóxico, biocompatível e biodegradável, produzido comercialmente pela desacetilação da quitina, que é, por sua vez um polissacárido presente no exoesqueleto de artrópodes, nemátodes e nas paredes celulares de fungos e em algumas algas (Rhazi *et al.*, 2000; Dahiya *et al.*, 2006).

Em relação a doenças do lenho da videira, a quitosana foi testada inicialmente contra agentes causais da esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia punctata*, mas os resultados não se revelaram muito promissores (Bruno *et al.*, 2001).

Posteriormente, Nascimento *et al.* (2007) estudaram a eficácia biológica da quitosana no crescimento micelial dos principais fungos associados a doenças do lenho e declínio da videira, para avaliar o seu efeito em plantas infectadas com *C. liriodendri* e *Pa. chlamydospora*. Relativamente a *C. liriodendri*, a quitosana promoveu significativamente o crescimento vegetativo da planta, e o número total de raízes, nas plantas infectadas tendo, simultaneamente, reduzido a incidência da doença, em comparação com as plantas testemunha. A eficácia conseguida pela quitosana foi

equivalente à alcançada pelos fungicidas convencionais, tebuconazol e as misturas ciprodinil+fludioxonil e carbendazime+flusilazole (Nascimento *et al.*, 2007).

1.8.4. Mistos

O tratamento com água quente com diferentes combinações tempo/temperatura tem sido usado, com sucesso, no controlo da doença de Petri e do pé-negro da videira em viveiros de vários países, tais como na Austrália (Laukart *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2004; Waite & May, 2005; Waite & Morton, 2007), Nova Zelândia (Graham, 2007), África do Sul (Crous *et al.*, 2001; Fourie & Halleen, 2004b) e Espanha (Gramaje *et al.*, 2009b). No entanto, a eficácia deste tipo de tratamento (30 minutos a 50°C) ainda se mantém um assunto controverso, visto que alguns autores reportaram insucesso na eliminação dos referidos patógenos (Rooney & Gubler, 2001; Whiting *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 2009; Serra *et al.*, 2009), assim como estragos que as elevadas temperaturas causam nas jovens plantas (Bleach *et al.*, 2009; Habib *et al.*, 2009). Waite & Morton (2007) sugerem que a tolerância das plantas e dos patógenos que as acompanham, ao tratamento com água quente, é afectada pelas condições ambientais do local de origem das estacas. Graham (2007) e Bleach *et al.* (2009) demonstraram que em estacas originárias de um clima frio (Nova Zelândia), os patógenos eram mais susceptíveis a tratamentos com água quente e que, o uso de temperaturas abaixo dos 50°C tinha reduzido a incidência de *Pa. chlamydospora* e *Cylindrocarpon* spp. Por seu lado, Gramaje *et al.* (2008, 2009b) demonstraram que eram necessários tratamentos com temperaturas acima de 51-52°C para reduzir drasticamente a germinação de conídios e crescimento micelial de *Pa. chlamydospora*, *Ph. aleophilum* e *Ph. parasiticum* em Espanha, sem efeitos prejudiciais nas estacas de videira.

Gramaje *et al.* (2010) verificaram que a germinação de conídios de *C. liriodendri* e *C. macrodidymum*, era inibida por temperaturas acima de 45°C, e que eram necessárias temperaturas acima de 48°C para inibir o crescimento micelial. Bleach *et al.* (2009) em ensaios *in vitro* semelhantes chegaram à conclusão de que um tratamento a 40-45°C inibia a germinação conidial de *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* e *C. destructans*. No entanto, verificaram que quando o patógeno era inserido na madeira de estacas com um ano, eram necessárias temperaturas mais elevadas para eliminar, totalmente, a infecção. Estes resultados indicam que os protocolos de tratamento com água quente (50°C, durante 30m), em utilização em vários viveiros a nível mundial (Crous *et al.*, 2001; Edwards *et al.*, 2004; Fourie & Halleen, 2004b; Waite & May, 2005; Halleen *et al.*, 2007a) poderão ser suficientes

para controlar *Cylindrocarpon* spp. O facto de os patogénios responsáveis pelo pé-negro da videira infectarem plantas de videira enxertadas a partir do solo do viveiro (Halleen *et al.*, 2003) enfatiza a importância de medidas de controlo adicionais para reduzir estas infecções (Halleen *et al.*, 2006). Os resultados apurados por Halleen *et al.* (2007b), Bleach *et al.* (2009) e Gramaje *et al.* (2010) demonstraram o potencial deste método no controlo da doença do pé-negro em plantas de viveiro, mas não evita a contaminação subsequente das plantas a partir de inóculo existente no solo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ISOLADOS EM ESTUDO

Estudaram-se 33 isolados de *Cylindrocarpon* spp., obtidos de videiras jovens (2 anos) com sintomas de declínio, oriundas de uma vinha localizada em Vidigueira, Alentejo (Quadro 2.1.), no ano de 2008. A vinha tem 200 hectares de área total, e o solo da região é argiloso arenoso. Parte dos isolados encontrava-se em colecção no LPVVA, conservados em meio de cultura de PDA, à temperatura de 5°C, na obscuridade. Outros foram obtidos no decurso do presente estudo, por isolamento microbiológico.

Quadro 2.1. Isolados de *Cylindrocarpon* spp. obtidos a partir de videiras com sintomas de declínio: código atribuído, referência original, casta e porta-enxerto (cultivar e clone).

Código do Isolado	Referência original	Linha	Casta	Porta-enxerto
	Talhão			
Cy68*	-	-	-	99R
Cy233	1	195	Touriga Nacional	110R
Cy234	21	331	Chardonnay	110R
Cy235	2	60	Cabernet Sauvignon	110R
Cy236	2	60	Cabernet Sauvignon	110R
Cy237	21	340	Chardonnay	110R
Cy238	15	295	Petit Verdot	110R
Cy239	6	100	Cabernet Sauvignon	110R
Cy240	13	205	Touriga Nacional	140RU
Cy241	1	60	Petit Verdot	110R
Cy242	13	195	Touriga Nacional	110R
Cy243	15	295	Touriga Nacional	110R
Cy244	8	195	Petit Verdot	110R
Cy245	8	195	Petit Verdot	110R
Cy246	5	295	Antão Vaz	110R
Cy247	5	295	Cabernet Sauvignon	110R
Cy248	22	460	Touriga Nacional	110R
Cy249	6	100	Touriga Nacional	110R
Cy250	14	213	Chardonnay	110R
Cy251	10	152	Chardonnay	110R
Cy252	21	340	Petit Verdot	110R
Cy253	21	340	Petit Verdot	110R
Cy254	15	290	Touriga Nacional	110R
Cy255	15	290	Touriga Nacional	110R
Cy256	10	150	Petit Verdot	110R
Cy257	10	150	Petit Verdot	110R
Cy258	14	300	Cabernet Sauvignon	110R
Cy259	9	160	Touriga Nacional	110R
Cy260	1	40	Cabernet Sauvignon	110R
Cy261	7	110	Touriga Nacional	110R
Cy262	2	20	Cabernet Sauvignon	110R
Cy263	7	110	Touriga Nacional	110R
Cy264	17	295	Petit Verdot	110R
Cy265	10	150	Touriga Nacional	110R

*origem: isolado obtido a partir porta-enxerto do Ribatejo e Oeste.

2.2. ISOLAMENTOS MICROBIOLÓGICOS E CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO DO GÉNERO *CYLINDROCARPON*

O material vegetal foi lavado abundantemente em água corrente, tendo-se de seguida procedido à remoção do ritidoma. Posteriormente, seccionaram-se as videiras transversalmente, para avaliação da presença de necroses no lenho. Das zonas necrosadas retiraram-se fragmentos de madeira que foram desinfectados numa solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 7% durante 1 minuto e mergulhados em água destilada, também durante 1 minuto. Os fragmentos foram de seguida secos em papel de filtro e colocados em placas de Petri contendo 20ml de PDA suplementado com cloranfenicol (250mg/l). As placas foram a incubar à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, em posição invertida e na obscuridade, por um período de 12 a 15 dias. No final deste período, procedeu-se ao levantamento das espécies de fungos presentes nas placas e à repicagem das colónias de *Cylindrocarpon* spp. para placas de Petri contendo PDA. As placas foram incubadas em estufa a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, em posição invertida, na obscuridade. Após o período de incubação necessário ao desenvolvimento das culturas e à esporulação, purificaram-se as culturas pelo método do esporo único.

2.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS

Para a observação das características culturais, foram utilizados os meios de cultura PDA e OA. As placas de Petri com 90mm de diâmetro, contendo 20 ml de meio de cultura, foram inoculadas com os isolados em estudo e colocadas em estufa a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade, durante 12 dias (Samuels & Brayford, 1990). Como inóculo foram utilizados cilindros de gelose com, aproximadamente, 3 mm de diâmetro e de altura, retirados da periferia de cada uma das colónias dos isolados em estudo, com o auxílio de um anel cortante.

No final do período de incubação (12 dias), observaram-se as seguintes características das culturas (frente e verso): aspecto cultural, densidade da colónia, coloração, frente de crescimento, aspecto à transparência e zonagem. A cor da colónia foi determinada por comparação com a carta de cores de Rayner (1970).

A caracterização morfológica das estruturas vegetativas e reprodutivas dos isolados de *Cylindrocarpon* spp. foi efectuada em placas de Petri contendo SNA e PDA como meios de cultura (Samuels & Brayford, 1990; Brayford, 1993).

O meio SNA promove uma esporulação mais uniforme de *Cylindrocarpon* spp. e não causa degeneração cultural, ao contrário do que acontece quando se utiliza PDA (Samuels & Brayford, 1990; Brayford, 1993).

Após a preparação do meio SNA inoculou-se uma placa com cada um dos isolados em estudo e colocaram-se em estufa de incubação com 12 horas de luz emitida por lâmpadas tubulares “Philips TL 15W/33”, à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 10 dias. No final deste período, foram retirados quadrados de gelose com, aproximadamente 1cm^2 ($1\text{cm} \times 1\text{cm}$), que foram montados em lâminas de vidro, com uma gota de água e uma lamela (Brayford, 1993). As preparações dos isolados Cy233, Cy237, Cy238, Cy239, Cy240, Cy241, Cy243, Cy244 e Cy255 foram observadas em microscópio de contraste de interferência “Leica Dm 2500”, com uma ampliação de 400x, com o objectivo de descrever as estruturas vegetativas e reprodutivas formadas. As preparações foram fotografadas com a máquina incorporada no microscópio e de seguida, procedeu-se à avaliação das características biométricas dos conídios com o auxílio do software “Leica Application Suite v3.3.0”. As preparações dos restantes isolados foram observadas em microscópio óptico “Laborlux S, Leitz”, utilizando uma ampliação de 400x.

Para cada isolado, determinaram-se os valores extremos e as médias do comprimento e da largura, bem como o respectivo desvio padrão, de micro e macroconídios, consoante o número de septos.

2.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE CYLINDROCARPON SPP.

2.4.1. Condições de cultura dos isolados

Os isolados foram repicados para placas de Petri de 90mm de diâmetro contendo 15 ml de PDA, e mantidos em estufa de incubação à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ para crescimento micelial. Ao fim de 10 dias, cortaram-se dois cilindros de gelose, com 3mm de diâmetro e de altura, da extremidade de cada uma das colónias dos isolados em estudo, que foram colocados em balões Erlenmyer de 50 ml de capacidade contendo 25 ml de “Potato Dextrose Broth” (PDB, Difco Laboratories, Detroit, MI,

EUA). Os balões foram mantidos na obscuridade, sob agitação recíproca e contínua (90 lances/minuto) (agitador Edmund Brühl), a uma temperatura de 20±1°C durante 4 a 5 dias. Nestes estudos de variabilidade genética utilizaram-se 17 isolados referência de *Cylindrocarpon* que se identificam no quadro 2.

Quadro 2.2. Isolados de *Cylindrocarpon* spp. utilizados nos estudos de variabilidade genética: isolado, data de colheita, local de colheita, hospedeiro, espécie.

Isolado	Data de colheita	Local de colheita	Hospedeiro (Casta/Porta-enxerto)	Espécie
Cy1		1992 Dois Portos, Torres Vedras	99 R Malvasia Fina / 1103	<i>C. liriodendri</i>
Cy20		1996 São Paio, Gouveia	P	<i>Cylindrocarpon</i> sp.11**
Cy22		1996 Silgueiros, Viseu	Aragonez / 99 R	<i>Cylindrocarpon</i> sp.11**
Cy23		1997 Ribatejo e Oeste	99 R	<i>Cylindrocarpon</i> sp.7*
Cy117	Desconhecido	Califórnia, EUA	<i>Vitis</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp.6*
Cy134	Desconhecido	Ciudad Real, Villarubia de los Ojos, Espanha	<i>Vitis</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp.5*
Cy135		2003 Portugal, Estremoz	Aragonez /3309C	<i>Cylindrocarpon</i> sp.3*
Cy145		2003 Portugal, Estremoz	Aragonez / 3309C	<i>Cylindrocarpon</i> sp.3*
Cy155		2004 Portugal, Alter do Chão	Alfrocheiro / SO4	<i>Cylindrocarpon</i> sp.12**
Cy159		2004 Portugal, Alcácer do Sal, Torrão	Sangiovese / 1103P	<i>Cylindrocarpon</i> sp.6*
Cy217		2007 Torres Vedras	Gouveio / -	<i>C. pauciseptatum</i>
Cy214		2007 Torres Vedras	Grenache / -	<i>C. sp4*</i>
Cy228		2003 Portugal	<i>Ficus</i> sp.	
CBS 112603		1999 Darling, Western Cape, South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Neonectria macrodidymum</i>
CBS 113552	-	Candy P, New Ground, New Zealand	<i>Vitis</i> sp.	<i>Cylindrocarpon</i> sp.6*
CBS 564.95				<i>Cylindrocarpon</i> sp.
CBS 537.92				<i>Cylindrocarpon</i> sp.12**
CBS 773.83				<i>Cylindrocarpon</i> sp.7*

* - identificação de acordo com Cabral *et al.* (2008);

** - "*C. destructans*" complex, identificação de acordo com comunicação pessoal, Ana Cabral.

2.4.2. Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA foi feita utilizando uma adaptação do protocolo descrito por Ceniz (1992).

De maneira a recolher o micélio formado nos balões de Erlenmeyer, filtraram-se as culturas utilizando o "Sistema Asséptico Sterifil®" (Millipore) no qual foi colocado um papel de filtro esterilizado. O micélio retido no papel foi raspado com o auxílio de um bisturi esterilizado à chama, e colocado em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. O micélio foi lavado com 500 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) e procedeu-se a uma centrifugação durante 10 minutos a 13000 rpm (Centrifuga Hettich 32R). Decantou-se o sobrenadante e esmagou-se o micélio com o auxílio de um

“piston pellet” (Eppendorf). Adicionaram-se 500 µl de tampão de extracção Cenis (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM EDTA; 0,5% SDS, p/v) e agitaram-se os tubos por inversão. Juntaram-se 150 µl de acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e colocaram-se os tubos a -20°C durante 10 minutos. De seguida os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 13000 rpm e à temperatura de 4°C. Procedeu-se à recolha do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga e foi adicionado igual volume de isopropanol frio, para precipitação do DNA. Após 5 minutos, à temperatura ambiente, os tubos foram agitados lentamente, por inversão, até se observar a formação de um “novelo” e centrifugaram-se durante 10 minutos a 13000 rpm e a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante, lavaram-se os “pellets” com 1 ml de etanol a 70%, procedeu-se a nova centrifugação durante 5 minutos (13000 rpm, 4°C) e eliminou-se o sobrenadante. Após secagem do precipitado, foram adicionados 50 µl de tampão TE (pH 8,0) e os tubos foram colocados a 4°C de forma a promover a solubilização dos ácidos nucleicos.

Depois de efectuada a extracção do DNA procedeu-se à avaliação da quantidade e qualidade do mesmo.

A avaliação destes parâmetros foi efectuada por electroforese em gel de agarose a 1% utilizando TBE 0,5x (45 mM Tris-base; 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA, pH8,0) (Sambrook *et al.*, 1989), por comparação com a gama de quantidades conhecidas (25, 50, 100, 250 e 500 ng/µl) de DNA do fago λ (Amersham Pharmacia). A electroforese decorreu numa tina horizontal (“Horizon 20-25, Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus”, Life Technologies, GibcoBRL) durante 1 hora a 100 V, corrente esta gerada pela fonte “Electrophoresis Power Supply – EPS 1000” (Pharmacia Biotec), tendo-se utilizado TBE 0,5x como tampão de corrida.

No final da electroforese o gel foi corado durante 15 minutos com uma solução de brometo de etídio (0,5 µg/l) e posteriormente imerso em água destilada durante 30 minutos. Os resultados da quantificação foram visualizados num transiluminador de luz UV (312 nm) “BTX 20.M” (Uvitec Limited) e registados utilizando uma impressora térmica “ Mitsubishi Model P91”. Foram constituídas soluções de trabalho para cada isolado a 10 ng/µl utilizando água MilliQ esterilizada.

2.4.3. Análise da variabilidade dos isolados de *Cylindrocarpon* spp.

Para a análise da variabilidade genética dos isolados de *Cylindrocarpon* em estudo recorreu-se à utilização de marcadores aleatórios ISSR (“Inter-Single Sequence Repeat”) e marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), para averiguar

a existência de grupos bem definidos que permitissem a distinção de diferentes espécies na colecção em estudo.

2.4.3.1 Análise da variabilidade dos isolados por ISSR-PCR

Foram testados quatro iniciadores, HVH(TG)₇, (AG)₈YT, (TCC)₅ e MR (GAGGGTGGCGGTTCT), em que R= A/G; Y=C/T; H=A/C/T e V=A/C/G (Bridge *et al.*, 1997; Talhinhos *et al.*, 2003) (Quadro 2.2).

Quadro 2.3. Códigos e sequências dos oligonucleótidos iniciadores ISSR ("Inter-Single Sequence Repeat")-PCR utilizados para a caracterização da variabilidade de isolados de *Cylindrocarpon* spp.

Código	Sequência	Tm (1 M Na ⁺)	%GC	Comprimento
(AG) ₈ YT	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYT 3'	52°C	50	18pb
HVH(TG) ₇	5' HVHTGTGTGTGTGTGTG 3'	52°C	59	17pb
(TCC) ₅	5' TCCTCCTCCTCCTCC 3'	50°C	67	15 pb
MR	5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'	50°C	67	15 pb

Todas as reacções de PCR foram efectuadas num termociclador "Biometra T-Gradient", utilizando Taq DNA polimerase e MgCl₂ da "Fermentas" (Alemanha, UE), e dNTP's da "Amersham Pharmacia". Cada reacção de amplificação foi realizada em 12,5 µl, incluindo 1x tampão de PCR com KCl (10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40), 3 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de iniciador (sintetizados pela Invitrogen), 0,5 U de Taq DNA polimerase e 25 ng de DNA genómico (adaptado de Alves *et al.*, 2007). Como controlo negativo utilizou-se a mesma mistura de amplificação, tendo o DNA sido substituído por água MilliQ esterilizada. Para os iniciadores referidos foram usados os programas de amplificação indicados nos Quadros 2.3 e 2.4 (Talhinhos *et al.*, 2003).

• Iniciadores (TCC)₅ e MR

Quadro 2.4. Programa de amplificação utilizados para os iniciadores (TCC)₅ e MR.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré – desnaturação	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	
Hibridação	50°C	45 segundos	40
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

• Iniciadores HVH(TG)₇ e (AG)₈YT

Quadro 2.5. Programa de amplificação utilizados para os iniciadores HVH(TG)₇ e (AG)₈YT.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré – desnaturação	94°C	4 minutos	1
Desnaturação	94°C	30 segundos	
Hibridação	52°C	45 segundos	40
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	10 minutos	1

Os produtos obtidos na amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5x, utilizando-se para isso uma tina horizontal ("Horizon 20-25, Horizontal Gel Electroforesis Apparatus", Life Technologies, GibcoBRL) e um pente de 30 dentes. Nas extremidades de cada gel incluiu-se um marcador de peso molecular "1 Kb Plus ladder" (Invitrogen). A electroforese decorreu durante 18 horas a 40V (corrente gerada pela fonte "Electroforesis Power Supply – EPS 1000", Pharmacia Biotec), à temperatura ambiente, tendo-se usado TBE 0,5x como tampão de corrida.

Os fragmentos amplificados foram visualizados e registados de modo idêntico ao referido em 2.4.2., e as imagens captadas mediante a utilização do programa Imagelink 2.5 (Image Capture and Transfer Software, Uvitec, Cambridge, UK) e guardadas em ficheiro TIFF.

A análise dos resultados foi feita com recurso ao programa GelCompar II versão 5.10 (Applied Maths). Para cada iniciador, os géis foram normalizados usando o marcador de peso molecular "1 Kb Plus ladder" como padrão. A detecção e emparelhamento das bandas foram efectuadas pelo próprio programa tendo sido rectificadas manualmente, gerando-se uma matriz binária de presença/ausência de bandas.

Para o cálculo da matriz de similaridade, aplicou-se à matriz binária o coeficiente de similaridade de "Dice" (para cada par de isolados, $S_D = 2a/(2a+b)$, em que a = número de bandas partilhadas e b = número de bandas não partilhadas) (Dice, 1954; Nei & Li, 1979). Sobre a matriz de similaridade obtida foi efectuada uma análise aglomerativa através do método UPMGA ("Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages" ou método de agrupamento em pares não-balanceados usando médias aritméticas), o que conduziu à obtenção de um dendrograma.

A análise foi efectuada para cada iniciador separadamente, assim como para o conjunto dos quatro. Para comprovar o ajustamento do dendrograma à matriz de similaridade, gerou-se a matriz de correlação cofenética, que se comparou com a matriz de similaridade, obtendo-se os coeficientes de correlação cofenética que traduzem o grau de distorção de cada nó do dendrograma produzido, em que o valor basal corresponde ao coeficiente de correlação cofenética do dendrograma total. Analisou-se ainda a robustez dos resultados (grupos formados) por análise de "bootstraps", reconstruindo os dendrogramas 2000 vezes.

2.4.3.2 Análise da variabilidade dos isolados por marcadores RAPD-PCR

Relativamente à utilização da técnica RAPD, seleccionaram-se 4 oligonucleótidos iniciadores (“primers”), da Operon Technologies Inc., sintetizados pela GibcoBRL (Quadro 2.5), que anteriormente produziram maior número de bandas polimórficas para amostras de DNA de *Cylindrocarpon* spp. (Cabral, 2002; Rego, 2004).

Quadro 2.6. Códigos e sequências dos oligonucleótidos iniciadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) utilizados para a caracterização da variabilidade de isolados de *Cylindrocarpon* spp.

Código	Sequência	Tm (1 M Na ⁺)	% GC	Comprimento
OPA-09	5' GGGTAACGCC 3'	32°C	70	10 pb
OPA-10	5' GTGATCGCAG 3'	32°C	60	10 pb
OPB-01	5' GTTTCGCTCC 3'	32°C	60	10 pb
OPD-13	5' GGGGTGACGA 3'	34°C	70	10 pb

Tal como com os iniciadores ISSR, todas as reacções foram efectuadas num termociclador “Biometra T-Gradient”, utilizando Taq DNA polimerase e MgCl₂ da “Fermentas” (Lituânia), e dNTP’s da “Amersham Pharmacia”. Cada reacção de amplificação foi realizada em 20 µl, incluindo 1x tampão de PCR com KCl (10 mM Tris-HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; 0,08% Nonidet P40), 3,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 12 pmol de iniciador (sintetizados pela Invitrogen), 1 U de Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA genómico. Como controlo negativo utilizou-se a mesma mistura de amplificação, tendo o DNA sido substituído por água MilliQ esterilizada. No Quadro 2.6 é apresentado o programa de amplificação utilizado (Cabral, 2002; Rego, 2004).

Quadro 2.7. Programa de amplificação utilizado na técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Pré – desnaturação	94°C	5 minutos	1
Desnaturação	94°C	2 minutos	35
Hibridação	37°C	1 minuto	
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão final	72°C	15 minutos	1

Os produtos obtidos na amplificação foram separados por electroforese, visualizados e registados de forma idêntica à referida anteriormente para a análise de variabilidade dos isolados com marcadores ISSR-PCR.

A análise dos resultados foi feita com o recurso ao program GelCompar II versão 5.10 (Applied Maths), tendo-se usado um processo de normalização e de processamento dos géis idêntico ao referido no ponto anterior (2.4.3.1.).

2.5. ESTUDO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *CYLINDROCARPON* SPP. EM PLANTAS DE VIDEIRA (*VITIS VINIFERA*).

2.5.1. Obtenção de material vegetal

No estudo de patogenicidade, foi seguido o método adaptado por Rego (2004) do trabalho realizado por Adalat *et al.* (2000). Utilizaram-se varas com cerca de um ano de idade, pertencentes à casta Touriga Nacional (Vinha do Almotivo, ISA, Lisboa) e que não apresentavam sintomas evidentes associados a doenças do lenho. As estacas foram enraizadas em bancada com sistema de aquecimento, à temperatura de 20°C, em substrato composto por areia esterilizada coberta com uma camada de perlite, numa estufa de campo com sistema de “cooling” e sombreamento automático.

O enraizamento decorreu durante três meses, sob condições de nebulização automática por períodos de 5 segundos e frequência de 10 minutos.

2.5.2. Produção de inóculo, inoculação e condições de incubação

Foram testados 30 dos 33 isolados de *Cylindrocarpon* spp. em estudo e um isolado de referência para *C. liriodendri* (Cy68), retirado da colecção do LPVVA. O estudo da totalidade dos isolados não foi possível devido à ocorrência de contaminações nas diversas tentativas de obtenção do inóculo.

Para obtenção do inóculo, foram inoculados balões Erlenmeyer contendo 250 ml de “Czapek Dox Liquid Medium (Modified)” (Oxford, LTD), com discos miceliais de 3 mm de diâmetro, destacados da periferia de colónias obtidas em placa de Petri contendo PDA. As culturas foram mantidas em agitação recíproca e contínua (90 batidas/minuto) (Agitador Edmund Brühl), durante 14 dias, a cerca de 20°C na obscuridade.

As plantas foram retiradas da bancada de enraizamento, lavadas com água corrente, para retirar resíduos de areia e perlite que se encontravam aderentes às raízes e o sistema radicular foi ligeiramente aparado com uma tesoura esterilizada. Na inoculação procedeu-se à imersão total do sistema radicular de 10 plantas por isolado, em aproximadamente 500 ml de suspensão conidial durante 50 minutos. Na testemunha, substitui-se a suspensão conidial por água destilada, mantendo-se o tempo de imersão.

Após a inoculação, as plantas foram envasadas em sacos de polietileno preto com cerca de 1 dm³ de capacidade, contendo uma mistura de terra vegetal, turfa e areia (2:1:1, v/v). Durante o período do ensaio, as plantas foram regadas regularmente, por gravidade.

O ensaio decorreu na mesma estufa de campo, onde se tinha procedido ao enraizamento das estacas, provida de um sistema de “cooling” e sombreamento automático, sob condições aproximadas de temperatura diurna de 24±5°C, temperatura nocturna de 18°C e 12 horas de luz solar.

2.5.3. Parâmetros avaliados

Seis meses após a inoculação, as plantas foram desenvasadas e lavadas com água corrente para eliminar as partículas de substrato aderentes ao sistema radicular. De seguida foram registados os seguintes parâmetros de severidade da doença, de acordo com uma adaptação feita à metodologia descrita por Adalat *et al.* (2000) e Rego *et al.* (2001b):

- comprimento do lançamento maior;
- número total de raízes;
- comprimento da maior raiz formada.

2.5.4. Reisolamentos

Depois de realizadas as avaliações descritas no ponto anterior, as plantas foram cortadas longitudinalmente na zona basal e com o auxílio de um bisturi desinfectado à chama, retirou-se o ritidoma de cada uma delas. Após a observação da zona de corte, para avaliação da presença de necroses basais, geralmente relacionadas com a doença, retiraram-se 6 fragmentos de madeira, por planta, os quais foram desinfectados numa solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 7% durante 1 minuto e, mergulhados em água destilada, também, durante 1 minuto. Os fragmentos de madeira foram secos em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri com meio PDA (20 ml) e cloranfenicol (250 mg/L de meio). As placas foram incubadas em posição invertida, durante cerca de 12 dias. Decorrido este período, procedeu-se à avaliação do número de colónias de *Cylindrocarpon* presentes em cada placa. O procedimento para as plantas testemunha foi exactamente idêntico.

2.5.5. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram sujeitos a análise de variância (ANOVA) com efeitos fixos e distribuição normal, utilizando um delineamento a um factor, totalmente casualizado e com um nível de significância de 0,05.

A comparação das médias efectuou-se recorrendo ao teste de Tukey HSD (com nível de significância de 0,05) no programa STATISTICA 6.0. Todos os valores expressos em percentagem sofreram transformação angular $\arcsen\sqrt{x}$, antes de se proceder à ANOVA. Os resultados da referida análise podem ser observados no Anexo A.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E MORFOLÓGICA

As características culturais dos isolados de *Cylindrocarpon* spp. em estudo, observadas nos meios de cultura PDA e OA, após 10 dias de incubação, à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$, na obscuridade, estão descritas no Quadro 3.1, e algumas podem ser observadas na Figura 3.1.

Observando a face superior das colônias, verifica-se que o aspecto cultural varia entre o cottonoso (Cy234, Cy236, Cy243, Cy246, Cy248, Cy258), o feltroso (Cy233, Cy235, Cy237, Cy240, Cy241, Cy242, Cy244, Cy245, Cy247, Cy249, Cy250, Cy251, Cy259, Cy260, Cy261, Cy262, Cy263, Cy264, Cy265) e o feltroso a cottonoso (Cy238, Cy239, Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256, Cy257).

A densidade das colônias variou entre fraca e forte, sendo fraca a média para o isolado Cy233, média para os isolados Cy235, Cy237, Cy238, Cy239, Cy240, Cy241, Cy242, Cy244, Cy245, Cy247, Cy249, Cy250, Cy251, Cy259, Cy260, Cy261, Cy262, Cy263, Cy264, Cy265 e média a forte para os isolados Cy234, Cy236, Cy243, Cy246, Cy248, Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256, Cy257, Cy258 (Quadro 3.1.).

Em relação à coloração do micélio observou-se uma variação considerável entre as cores: “chestnut” com micélio aéreo “buff” a “cinnamon” (Cy235, Cy242, Cy247, Cy249, Cy237, Cy240, Cy244, Cy250, Cy251, Cy259, Cy262, Cy263, Cy245, Cy260, Cy261, Cy264, Cy265); “dark sienna” a “chestnut” com micélio aéreo “buff” a “luteous” (Cy234, Cy236, Cy246, Cy248, Cy258); “orange” a “sienna”, com micélio aéreo “safron”, margem “buff” a “pale luteous” (Cy238, Cy239); “sienna” com micélio “dark luteous” a “sienna” e margem “buff” a “luteous” (Cy243); “chestnut” com micélio aéreo “sienna” e margem “luteous” (Cy233); “sienna” a “safron” com micélio aéreo “luteous” (Cy241); “dark safron” to “cinnamon” com micélio aéreo “buff” a “lighth luteous” (Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256, Cy257).

No que diz respeito à frente de crescimento, todos os isolados apresentaram frente regular, à exceção dos isolados Cy234, Cy235, Cy236, Cy242, Cy246, Cy247, Cy248, Cy249 e Cy258 que apresentaram frente de crescimento irregular (Quadro 3.1.).

Todos os isolados apresentaram um aspecto homogêneo, à transparência. Relativamente à zonagem, os isolados Cy243, Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256 e

Cy257 demonstraram ausência desta característica, os isolados Cy234, Cy236, Cy246, Cy248 e Cy258 apresentaram zonagem concêntrica ou ausente, e em todos os restantes verificou-se a presença de zonagem concêntrica.

No que diz respeito à face inferior das culturas, todos os isolados apresentaram características idênticas às da face superior, excepto na cor.

Quadro 3.1. Características culturais de 33 isolados de *Cylindrocarpon* spp. (Cy) em Gelose de Batata Dextrosada (PDA), ao fim de dez dias, sob condições de obscuridade e temperatura de 20±1°C

Face Superior						Face inferior	
Isolado	Aspecto cultural	Densidade da colônia	Coloração	Frete de crescimento	Aspecto à transparência	Zonagem	
Cy235, Cy242, Cy247, Cy249	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff a cinnamon. OA:cinnamon to dark sienna, micélio buff a luteous	irregular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA, por vezes ausente em OA	idem face superior excepto na cor (PDA: sienna to chestnut; OA:light cinnamon a dark fulvous)
Cy237, Cy240, Cy244, Cy250, Cy259, Cy262, Cy263, Cy245, Cy260, Cy261, Cy264, Cy265	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff a cinnamon. OA:cinnamon to dark sienna, micélio buff a luteous	regular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA, por vezes ausente em OA	idem face superior excepto na cor (PDA: sienna to chestnut; OA:light cinnamon to dark fulvous)
Cy251	feltroso	média	PDA: chestnut com micélio aéreo buff a cinnamon. OA:chestnut, micélio buff	regular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA, por vezes ausente em OA	idem face superior excepto na cor (PDA: sienna to chestnut; OA:light chestnut)
Cy234, Cy236, Cy246, Cy248, Cy258	cotonoso em PDA, feltroso em OA.	média a forte	PDA: dark sienna a chestnut com micélio aéreo buff a luteous. OA: ligh sienna a chestnut com micélio aéreo buff a luteous e margem safron a luteous.	irregular por vezes regular em OA	homogéneo em PDA	concêntrica ou ausente	idem face superior excepto na cor (PDA: chestnut a dark chestnut; OA: ligh cinnamon a ligh chestnut)
Cy238, Cy239	feltroso a cotonoso	média em PDA, fraca a média em OA	PDA: Orange a sienna, com micélio aéreo safron, margem buff a pale luteous. OA: Pale luteous a luteous, com margem luteous	regular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA, ausente em OA	idem face superior excepto na cor (PDA: dark orange a sienna; OA: luteous a orange)
Cy243	cotonoso	média a forte	PDA: sienna com micélio dark luteous a sienna e margem buff a luteous.	regular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior excepto na cor (PDA: chestnut; OA: light sienna)
Cy233	feltoso	fraca a média	PDA: chestnut com micélio aéreo sienna e margem luteous. OA: sienna com micélio aéreo raso saffron e margem luteous.	regular, por vezes irregular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA, ausente em OA	idem face superior excepto na cor (PDA: chestnut a umber, OA: sienna a saffron.
Cy241	feltroso	média	PDA: sienna a saffron com micélio aéreo luteous. OA: chestnut com micélio aéreo saffron.	regular	homogéneo em PDA	concêntrica em PDA.	idem face superior excepto na cor (PDA: chestnut a umber; OA: sepia)
Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256, Cy257	feltroso a cotonoso	média a forte em PDA, fraca a média em OA	PDA: dark safron to cinnamon com micélio aéreo buff to ligh luteous. OA: sienna com micélio aéreo buff	regular	homogéneo em PDA	ausente	idem face superior excepto na cor (PDA: ochreous a fulvous; OA: ochreous a ligh fulvous)

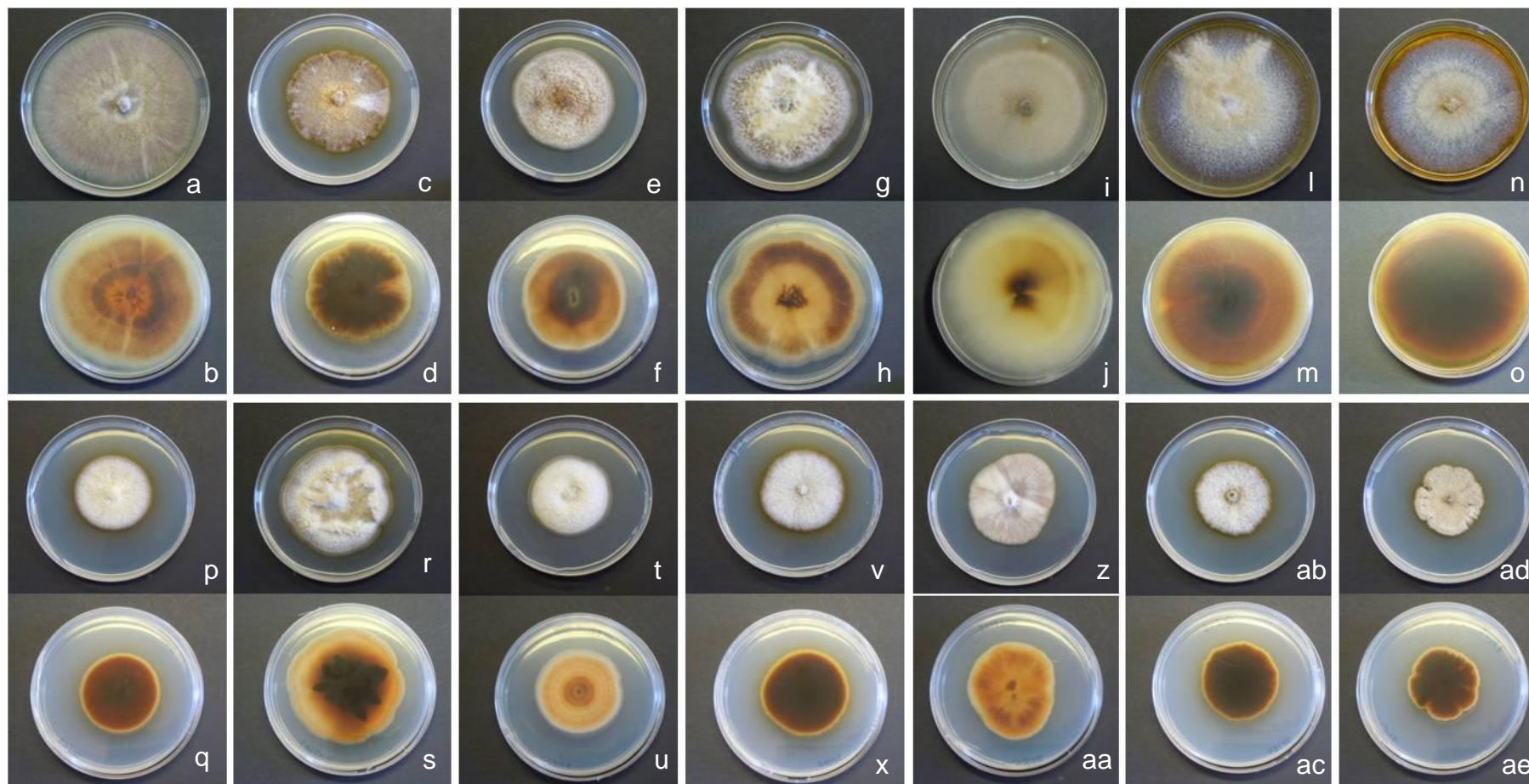


Figura 3.1. Culturas de *Cylindrocarpon* spp. em meio PDA, ao fim de 10/12 dias, sob condições de obscuridade e temperatura de $20\pm1^{\circ}\text{C}$. Em cima: face superior. Em baixo: face inferior. a e b, Cy239; c e d, Cy243; e e f, Cy241; g e h, Cy253; i e j, Cy233; l e m, Cy258; n e o, Cy 244; p e q, Cy260; r e s, Cy264; t e u, Cy261; v e x, Cy250; z e aa, Cy238; ab e ac, Cy245; ad e ae, Cy246.

3.1.1. Características morfológicas e biométricas dos conídios

O meio de cultura SNA promoveu uma esporulação uniforme dos isolados de *Cylindrocarpon* em estudo. Neste meio os conidióforos de *Cylindrocarpon* spp. apresentaram-se hialinos e alongados e na maioria dos isolados, emergiram abundantemente a partir do micélio aéreo.

As observações microscópicas revelaram a presença de micro- e macroconídios nos 20 isolados que esporularam. Houve, no entanto, 13 isolados em que, até ao término deste trabalho, não se verificou esporulação.

Os microconídios foram produzidos em abundância na maioria dos isolados. Eram hialinos, cilíndricos com as extremidades arredondadas, por vezes adelgaçando para a base e apresentavam por norma 1 a 3 septos. Houve, contudo, isolados para os quais se verificou a presença de macroconídios com 4, 5 e mesmo 6 septos. O isolado Cy233 produziu alguns esporos com 4 e 5 septos, mas a maior abundância de esporos com 4 septos foi verificada para o isolado Cy239.

Os resultados referentes à determinação das características biométricas dos conídios com zero, um, dois e três septos, em meio SNA, referentes aos 22 isolados de *Cylindrocarpon* spp., apresentam-se no Quadro 3.2. Conforme se referiu anteriormente não foi possível registar as medições para 11 dos isolados em estudo, pois estes não esporularam, após várias tentativas.

A análise dos valores obtidos para cada isolado e para cada tipo de conídio permitiu a formação de vários grupos de isolados de *Cylindrocarpon* spp. O primeiro grupo é constituído pelos isolados Cy252, Cy253, Cy254 e Cy256. Os valores encontrados para estes isolados no que se refere aos diferentes tipos de esporos, estão em concordância como os valores encontrados na bibliografia para *C. liriodendri*, nomeadamente com os valores encontrados por Alaniz *et al.* (2007). O segundo grupo é constituído apenas pelo isolado Cy241 que apresentou valores intermédios entre os encontrados para o primeiro e o terceiro grupos, tendo ficado por isso agrupado isoladamente. Tendo em conta os valores obtidos, é possível que este isolado esteja enquadrado no complexo *C. destructans* pois os valores ajustam-se aos descritos na bibliografia. O terceiro grupo é constituído pelos isolados Cy244 e Cy258, que apresentaram valores que agrupam com os descritos, na bibliografia, para *C. macrodidymum*, nomeadamente com os descritos por Halleen *et al.* (2004) e por Alaniz *et al.* (2007). O quarto grupo é constituído pelos isolados Cy238 e Cy239, que

apresentaram valores semelhantes aos citados na bibliografia para a espécie descrita recentemente como *C. paupiseptatum*, nomeadamente por Schroers *et al.* (2008). Outras características apresentadas por estes isolados e, também referidas na bibliografia, são a predominância de esporos com 3 septos e a ausência de hilo visível. No entanto, foi para estes isolados que foram encontrados os valores mais elevados para os esporos com um septo.

Quadro 3.2. Características biométricas dos conídios de 20 isolados de *Cylindrocarpon* spp. em meio SNA, após dez dias de incubação, à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.

Dimensão dos conídios segundo o número de septos (μm)					
Isolado	Dimensão	0 septos	1 septos	2 septos	3 septos
Cy233	comprimento	-	(23,69-) 34,31 (-46,0) \pm 7,97	(37,0-) 42,47 (-47,68) \pm 4,20	(43,70-) 45,01 (-53,66) \pm 2,99
	largura	-	(5,39-) 7,51 (-9,09) \pm 1,07	(7,52-) 8,13 (-9,05) \pm 0,55	(7,65-) 8,62 (-9,10) \pm 0,46
Cy237	comprimento	-	(14,37-) 19,47 (-26,63) \pm 3,68	(25,57-) 30,04 (-34,43) \pm 2,94	(33,90-) 39,47 (-44,13) \pm 3,66
	largura	-	(3,78-) 4,57 (-5,23) \pm 0,48	(4,47-) 5,19 (-5,80) \pm 0,47	(4,97-) 6,51 (-7,35) \pm 0,70
Cy238	comprimento	-	(25,57-) 39,01 (-55,42) \pm 10,24	(21,15-) 31,72 (-42,55) \pm 6,71	(39,03-) 42,15 (-44,76) \pm 1,67
	largura	-	(7,28-) 8,12 (-9,02) \pm 0,58	(3,10-) 6,09 (-8,22) \pm 1,83	(7,44-) 8,41 (-9,33) \pm 0,56
Cy239	comprimento	-	(33,43-) 44,47 (-50,32) \pm 5,11	(31,38-) 38,58 (-43,41) \pm 4,34	(38,94-) 47,84 (-53,92) \pm 4,03
	largura	-	(6,44-) 7,70 (-9,28) \pm 0,84	(6,63-) 7,93 (-9,32) \pm 0,88	(6,70-) 8,05 (-9,14) \pm 0,74
Cy240	comprimento	-	(22,69-) 26,11 (-28,44) \pm 1,90	(25,68-) 30,52 (-36,82) \pm 3,83	(33,53-) 40,66 (-48,83) \pm 4,30
	largura	-	(4,52-) 4,98 (-5,44) \pm 0,31	(4,70-) 5,48 (-6,63) \pm 0,51	(5,60-) 6,72 (-7,34) \pm 0,46
Cy241	comprimento	-	(21,29-) 23,36 (-25,23) \pm 1,07	(22,37-) 25,73 (-27,64) \pm 1,78	(27,12-) 28,93 (-32,46) \pm 1,60
	largura	-	(4,45-) 5,29 (-6,98) \pm 0,73	(5,50-) 5,98 (-6,65) \pm 0,32	(5,57-) 6,63 (-7,39) \pm 0,61
Cy242	comprimento	-	(20,02-) 24,54 (-33,57) \pm 4,12	(21,45-) 28,80 (-34,30) \pm 3,97	(34,32-) 38,53 (-44,33) \pm 3,19
	largura	-	(4,04-) 4,91 (-6,43) \pm 0,77	(3,10-) 5,66 (-8,07) \pm 1,35	(5,62-) 6,31 (-8,58) \pm 0,98
Cy243	comprimento	-	(27,26-) 30,91 (-34,13) \pm 2,26	(26,36-) 34,38 (-42,58) \pm 4,06	(33,99-) 39,01 (-43,15) \pm 3,12
	largura	-	(4,13-) 4,89 (-5,44) \pm 0,38	(4,71-) 5,52 (-6,34) \pm 0,50	(4,83-) 5,67 (-6,54) \pm 0,49
Cy244	comprimento	-	(20,43-) 26,49 (-36,21) \pm 4,60	(22,37-) 29,83 (-34,32) \pm 3,50	(30,03-) 35,70 (-41,47) \pm 3,39
	largura	-	(4,04-) 5,62 (-8,89) \pm 1,60	(4,29-) 5,82 (-7,15) \pm 0,87	(5,62-) 6,57 (-8,58) \pm 1,01
Cy246	comprimento	(10,01-) 12,44 (-14,30) \pm 1,66	(20,02-) 23,17 (-28,60) \pm 2,76	(27,17-) 31,03 (-34,32) \pm 2,34	(28,06-) 33,61 (-38,61) \pm 2,80
	largura	(2,86-) 4,00 (-4,29) \pm 0,60	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 6,72 (-8,58) \pm 1,36	(4,29-) 6,72 (-8,58) \pm 1,36
Cy247	comprimento	(7,15-) 10,01 (-12,87) \pm 1,65	(15,73-) 20,16 (-22,88) \pm 2,07	(27,17-) 29,74 (-32,89) \pm 2,11	(34,32-) 40,90 (-48,62) \pm 4,53
	largura	(2,86-) 3,86 (-4,29) \pm 0,69	(2,86-) 4,15 (-4,29) \pm 0,45	(4,29-) 5,01 (-5,72) \pm 0,75	(5,72-) 6,72 (-8,58) \pm 1,18
Cy249	comprimento	(10,01-) 11,87 (-12,87) \pm 1,18	(18,59-) 21,74 (-24,31) \pm 1,62	(25,74-) 30,17 (-32,89) \pm 2,38	(35,75-) 41,33 (-57,20) \pm 6,23
	largura	(2,86-) 3,58 (-4,29) \pm 0,75	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 6,15 (-7,15) \pm 0,97
Cy252	comprimento	(7,15-) 10,58 (-14,30) \pm 2,45	(14,30-) 17,45 (-20,02) \pm 1,88	(11,44-) 20,31 (-28,60) \pm 5,17	(21,45-) 23,31 (-25,74) \pm 1,51
	largura	(2,86-) 4,00 (-5,72) \pm 0,90	(2,86-) 4,00 (-5,72) \pm 1,13	(4,29-) 5,29 (-7,15) \pm 0,97	(4,29-) 5,72 (-7,15) \pm 1,17
Cy253	comprimento	(5,72-) 7,87 (-10,01) \pm 1,39	(12,87-) 15,30 (-17,16) \pm 1,51	(18,59-) 21,59 (-25,74) \pm 2,47	(20,02-) 24,45 (-30,03) \pm 3,78
	largura	(1,43-) 3,15 (-4,29) \pm 0,90	(2,86-) 4,15 (-4,29) \pm 0,45	(2,86-) 4,43 (-5,72) \pm 0,81	(2,86-) 5,01 (-7,15) \pm 1,39
Cy254	comprimento	(7,15-) 9,15 (-11,44) \pm 1,68	(15,73-) 17,73 (-20,02) \pm 1,54	(18,59-) 21,31 (-24,31) \pm 1,71	(21,45-) 23,74 (-27,17) \pm 1,81
	largura	(2,86-) 3,43 (-4,29) \pm 0,74	(2,86-) 4,29 (-5,72) \pm 0,95	(4,29-) 5,01 (-5,72) \pm 0,75	(4,29-) 5,29 (-7,15) \pm 1,18
Cy256	comprimento	(7,15-) 9,15 (-11,44) \pm 1,38	(12,87-) 16,30 (-18,59) \pm 1,54	(17,16-) 21,31 (-24,31) \pm 2,18	(20,02-) 22,74 (-25,74) \pm 1,84
	largura	(2,86-) 3,43 (-4,29) \pm 0,74	(2,86-) 4,15 (-5,72) \pm 0,81	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 5,58 (-7,15) \pm 1,06
Cy258	comprimento	(7,15-) 11,15 (-14,30) \pm 2,00	(14,30-) 17,88 (-21,45) \pm 2,26	(21,45-) 29,46 (-32,89) \pm 3,46	(31,46-) 35,61 (-41,47) \pm 3,33
	largura	(2,86-) 3,58 (-5,72) \pm 1,01	(4,29-) 4,43 (-5,72) \pm 0,45	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(5,72-) 6,58 (-8,58) \pm 1,21
Cy259	comprimento	(7,15-) 9,44 (-11,44) \pm 1,54	(17,16-) 20,02 (-22,88) \pm 1,91	(18,59-) 22,17 (-25,74) \pm 2,36	(20,02-) 24,60 (-28,60) \pm 2,76
	largura	(2,86-) 3,43 (-4,29) \pm 0,74	(4,29-) 4,86 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 5,29 (-7,15) \pm 0,97	(2,86-) 4,72 (-5,72) \pm 0,97
Cy261	comprimento	(8,58-) 11,01 (-14,30) \pm 1,91	(12,87-) 18,73 (-21,45) \pm 2,73	(20,02-) 22,59 (-25,74) \pm 1,88	(20,02-) 23,45 (-25,74) \pm 1,93
	largura	(2,86-) 3,72 (-4,29) \pm 0,74	(2,86-) 4,72 (-5,72) \pm 0,97	(4,29-) 5,15 (-5,72) \pm 0,74	(4,29-) 5,58 (-7,15) \pm 1,06
Cy262	comprimento	(5,72-) 9,72 (-14,30) \pm 2,59	(12,87-) 17,88 (-21,45) \pm 2,36	(15,73-) 19,88 (-24,31) \pm 2,65	(27,17-) 30,46 (-32,89) \pm 2,14
	largura	(1,43-) 3,43 (-4,29) \pm 1,00	(2,86-) 4,72 (-5,72) \pm 0,97	(2,86-) 4,72 (-5,72) \pm 0,97	(4,29-) 5,58 (-7,15) \pm 1,06

*) os valores entre parêntesis correspondem aos valores mínimos e máximos, enquanto que o valor intermédio corresponde à média, \pm o desvio padrão. As médias derivam da observação de 30/40 conídios por isolado (10 por tipo de conídio).

O quinto grupo é constituído pelos isolados Cy237, Cy240, Cy242, Cy243, Cy246, Cy247, Cy249, Cy259, Cy261 e Cy262. Foi neste grupo que se encontrou a maior variação relativamente aos valores encontrados para os diferentes esporos. A maioria

dos valores encontrados ficou enquadrada entre os descritos na bibliografia para as espécies *C. macrodidymum* (Halleen *et al.*, 2004; Alaniz *et al.*, 2007) e *C. pauciseptatum* (Schroers *et al.*, 2008). No entanto, para alguns isolados, os valores foram mais próximos dos descritos para *C. liriiodendri*. É no entanto de referir que as maiores discrepâncias foram encontradas nas medições relativas aos esporos com 3 septos, sendo as medições relativas aos restantes tipos de esporos mais concordantes. O sexto e último grupo é constituído unicamente pelo isolado Cy233. As observações dos diferentes tipos de esporos produzidos por este isolado, revelaram esporos com 3 septos com valores aproximados aos descritos para *C. pauciseptatum* (Schroers *et al.*, 2008). No entanto, foi para este isolado que se verificaram os valores mais elevados para os esporos de 2 septos, valores estes que se aproximam claramente dos encontrados para os esporos com 3 septos, revelando que os dois tipos de esporos se apresentam normalmente com tamanho semelhante. Foi também neste isolado que se verificou a maior frequência de esporos com 4, 5 e mesmo 6 septos.

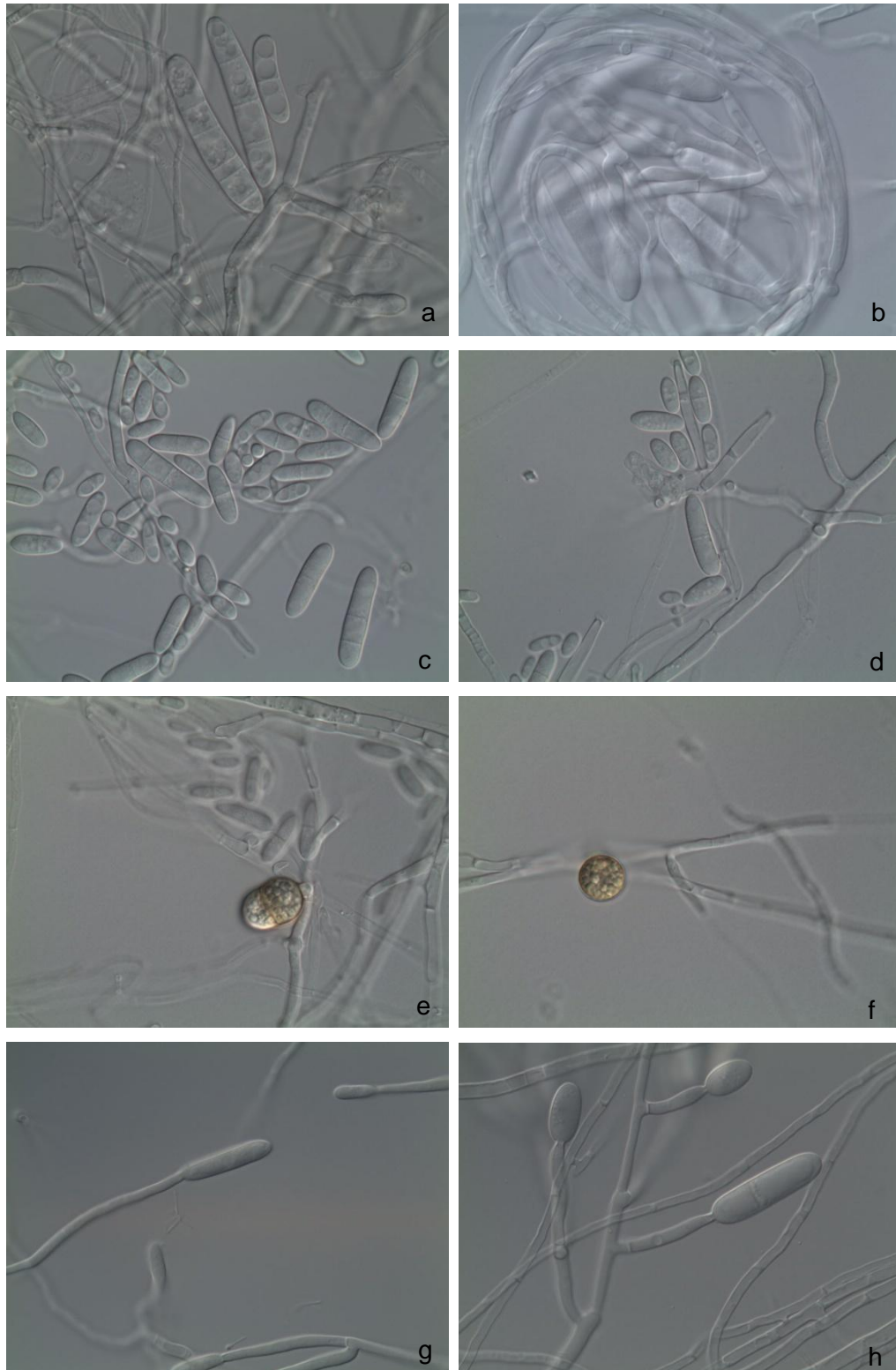


Figura 3.2. *Cylindrocarpon* spp. **a)** isolado Cy233 esporos com 1, 3 e 5 septos em meio SNA (spezieller nährstoffarmer agar) (x400); **b)** isolado Cy238; **c)** e **d)** isolado Cy241, micro e macroconídios em meio SNA (spezieller nährstoffarmer agar) (x400); **e)** e **f)** isolado Cy241, clamidóspors formados em meio de SNA (x400); **g)** isolado Cy255, conidióforo simples em meio SNA (spezieller nährstoffarmer agar) (x400) **h)** isolado Cy238, conidióforo ramificado em meio de SNA (spezieller nährstoffarmer agar) (x400).

3.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A Figura 3.3 representa o dendrograma consenso resultante da análise molecular efectuada com todos os marcadores ISSR e RAPD, e evidencia as relações taxonómicas entre os isolados, depois de aplicado o método aglomerativo UPGMA aos coeficientes de similaridade de Dice.

Procedendo à análise do dendrograma, observa-se que se formaram três grupos principais. Um grupo **A** sustentado por valores de “bootstrap” de 34%, grupo **B** sustentado por valores de “bootstrap” de 100% e um grupo **C** sustentado por valores de “bootstrap” de 60%.

Dentro do grupo **A** salientam-se dois sub-grupos: **A1**, sustentado por valores de “bootstrap” de 9% e o sub-grupo **A2** sustentado por valores de “bootstrap” de 100%. Dentro do sub-grupo **A1** ficaram agrupadas as espécies *C. liriodendri* (isolados Cy1, Cy252, Cy253, Cy254, Cy255, Cy256 e Cy257), *Cy. sp7* (isolados Cy23 e CBS773.83), *Cy. sp12* (isolados CBS573.92, Cy155 e Cy241), *C. pauciseptatum* (isolados Cy238, Cy239 e Cy217) e *Cy.sp11* (isolados Cy20 e Cy22). Dentro do sub-grupo **A2** ficou agrupada apenas a espécie *Cylindrocarpon sp3* (isolados Cy135, Cy145 e Cy243).

Dentro do sub-grupo **A1** são de salientar agrupamentos sustentados por valores de “bootstrap” elevados. Os isolados Cy253 e Cy254 com 99%; os isolados Cy23 e CBS773.83 com 100%; os isolados Cy238 e Cy239 com 98%, tendo este dois isolados agrupado com o isolado Cy217, com um valor de “bootstrap” de 100%. Os isolados Cy20 e Cy22, apresentam valores de 100%, tendo sido utilizados como isolados de referência de *Cylindrocarpon spp.*, sabendo-se à partida que se tratavam de isolados da mesma espécie.

Dentro do grupo **B** é de salientar o sub-grupo **B1** sustentado por valores de “bootstrap” de 90% no qual ficaram agrupadas as espécies *C. macrodidymum* (isolados Cy244, Cy250, Cy258 e CBS112603), *Cylindrocarpon sp6* (isolados Cy117, CBS113552) e *Cy. sp4* (isolados 17- Gr, Cy234, Cy235, Cy236, Cy237, Cy240, Cy242, Cy245, Cy246, Cy247, Cy248, Cy249, Cy251, Cy259, Cy260, Cy261, Cy262, Cy263, Cy264 e Cy265) e um segundo sub-grupo **B2**, com valores de “bootstrap” de 100% que apenas engloba os isolados Cy134 e Cy159 pertencentes à espécie *Cylindrocarpon sp5* (Cabral *et al.*, 2008) que foram também utilizados como isolados de referência. Dentro do sub-grupo **B1** é de salientar que os 20 isolados *Cylindrocarpon sp4* agruparam num ramo diferente de *C. macrodidymum* e

Cylindrocarpon sp6.. Esta separação em dois ramos distintos é apoiada por valores de “bootstrap” de 90%. Dentro dos isolados pertencentes a *Cylindrocarpon* sp4, verificou-se uma grande heterogenidade. Este facto leva à necessidade de rever os resultados de maneira a tentar obter um melhor ajustamento do dendrograma. A espécie *C. macrodidymum* e *Cylindrocarpon*. sp6 estão agrupadas em dois ramos distintos com um valor de “bootstrap” de 71%.

Dentro do grupo **C** ficaram apenas agrupados os isolados CBS564.95, Cy228 e Cy233. Os dois primeiros isolados foram utilizados como isolados de referência *Cylindrocarpon* spp., pertencendo o último à colecção em estudo. Estes isolados ficaram num grupo totalmente distinto dos descritos anteriormente, e mesmo dentro do grupo **C**, os sub-grupos não são sustentados por valores de “bootstrap” muito elevados.

A análise molecular obtida para o isolado Cy233 confirmou as diferenças já registadas na caracterização morfológica e cultural. Tal como se pode ver no dendrograma, com as relações taxonómicas entre os isolados, depois de aplicado o método aglomerativo UPGMA aos coeficientes de similaridade de Dice (Figura 3.3), o isolado Cy233 surge taxonomicamente afastado. Com efeito, este isolado já se tinha distinguido dos restantes isolados da colecção em estudo e mesmo de isolados já identificados e previamente descritos em *Vitis* spp., com base nos parâmetros morfo-culturais Este facto corrobora a possibilidade de se estar na presença de uma nova espécie do género *Cylindrocarpon*.

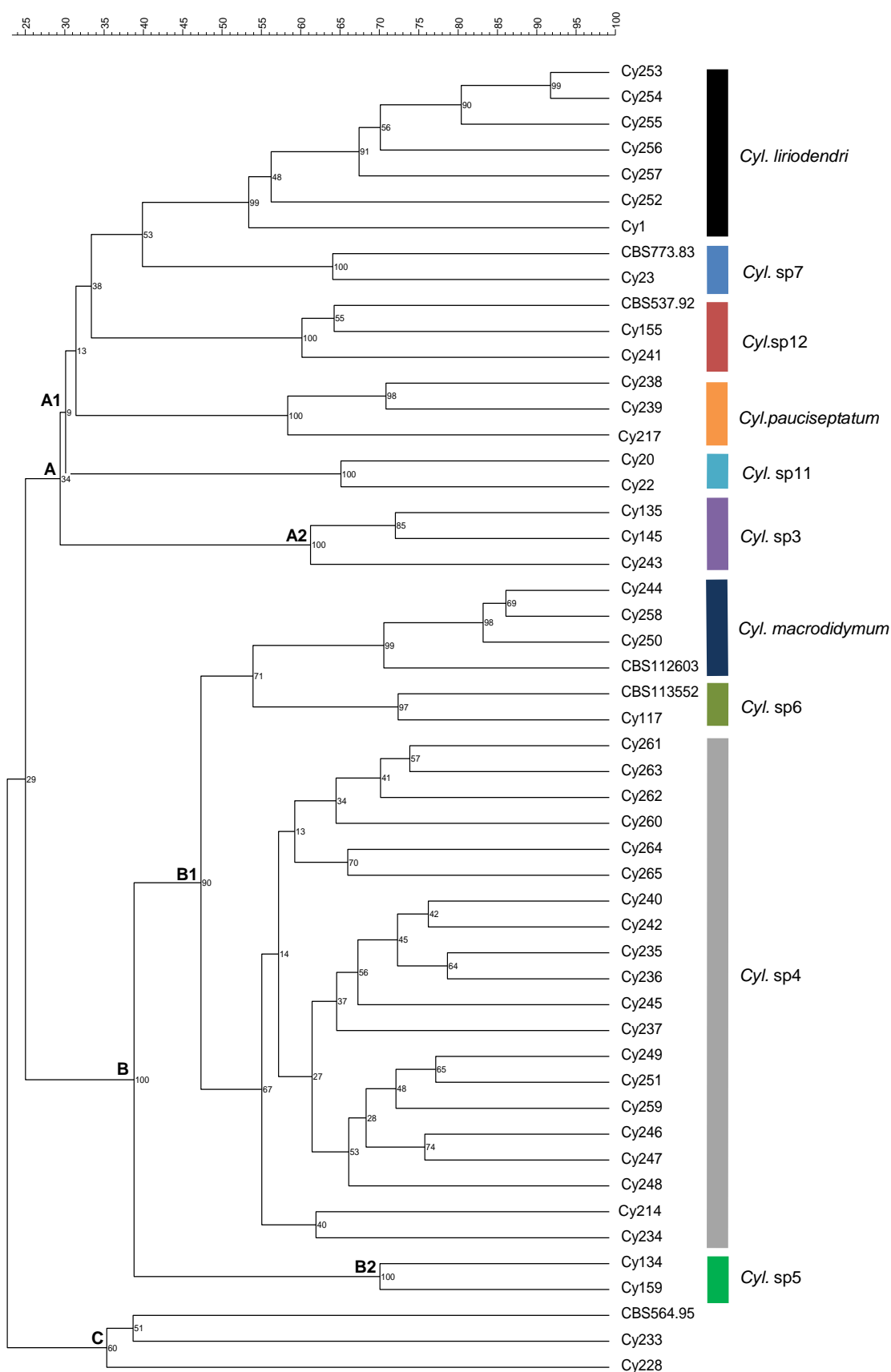


Figura 3.3. Dendrograma resultante da análise por RAPD e ISSR de 51 isolados de *Cylindrocarpon* spp., produzido por UPGMA (Método de Agrupamento em Pares Não-balanceados usando Médias Aritméticas) sobre matrizes de similaridade (Dice). Em cada nó representam-se os valores percentuais de “bootstrap” calculados a partir de 2000 repetições da matriz de similaridade. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.

3.3. DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *CYLINDROCARPON* SPP. EM *VITIS* SPP.

No final do período de incubação, as plantas de videira apresentavam cloroses nas folhas e, nalguns casos, avermelhamento precoce e dimensões reduzidas.

A nível radicular, as raízes surgem necrosadas, apresentando uma cor acinzentada a negra, consoante a intensidade do ataque. Por vezes, observa-se o desprendimento do ritidoma radicular. Sob o ritidoma doente pode observar-se o desenvolvimento de uma necrose acastanhada na região basal da planta, típica da doença.

Cortes transversais, efectuados ao longo da planta, permitem detectar a existência de necroses nos tecidos corticais.

3.3.1. Percentagem de reisolamentos

Relativamente à percentagem de reisolamentos verificou-se a ocorrência de uma variação entre os 12% e os 75%. A comparação estatística dos resultados revelou que as percentagens mais elevadas foram obtidas para os isolados Cy244, Cy236, Cy259, Cy242 e Cy246 e que estas diferiram significativamente das alcançadas para os isolados Cy250 e Cy252. As percentagens de reisolamento, para os restantes isolados, não diferiram de um ou de outro extremo (Figura 3.4).

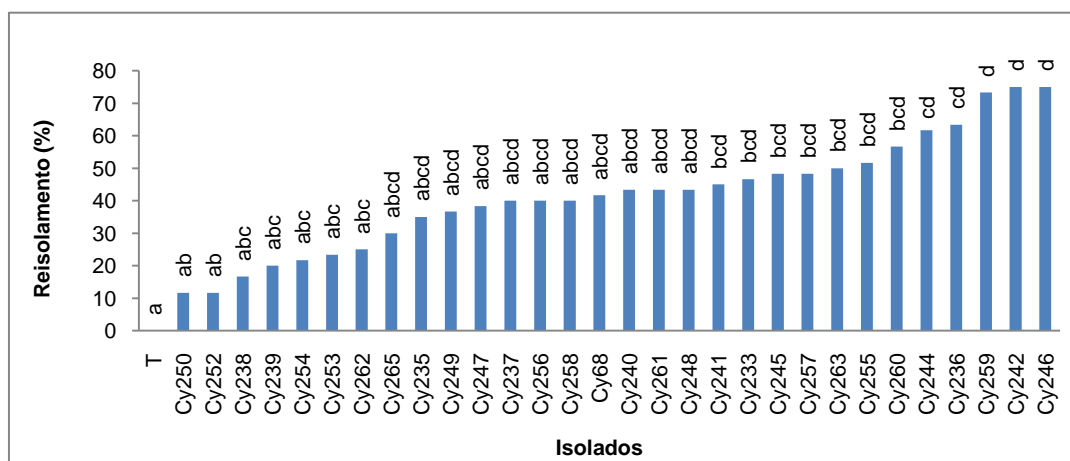


Figura 3.4. Percentagens médias de reisolamentos, obtidas a partir de videiras da casta Touriga Nacional inoculadas com 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp. Cy, isolados de *Cylindrocarpon*, T, testemunhas. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tuckey HSD), a análise estatística foi efectuada, convertendo previamente os valores percentuais em $\arcsen\sqrt{x}$ (Anexo A).

No que diz respeito às testemunhas, não se reisolou a partir de nenhuma delas o fungo inoculado.

Neste grupo de isolados, provenientes da mesma vinha, exceptuando o Cy68 que foi utilizado como referência para *C. liriodendri*, estão presente diversas espécies do género *Cylindrocarpon*, factor que foi também investigado no decorrer deste trabalho. O processamento dos dados obtidos durante os reisolamentos revelou que a média de reisolamento mais elevada se verificou para três isolados identificados como pertencentes a *Cylindrocarpon* sp4 Cy259, Cy242 e Cy246), aparentando serem estes os isolados mais virulentos. Relativamente aos isolados menos virulentos, o isolado Cy250 foi identificado como *C. macrodidymum* e o isolado Cy252 como pertencente à espécie *C. liriodendri*.

3.3.2. Número total de raízes

Quanto ao número total de raízes formadas, e por comparação das médias obtidas, verificaram-se diferenças significativas entre vários isolados. Dos 30 isolados testados, o número máximo de raízes encontrado foi de 73,1 (média) para o isolado Cy261, tendo o mínimo sido verificado para o isolado Cy249 com o valor médio de 12,9 (Figura 3.5). A comparação revelou ainda diferenças significativas entre este dois isolados. Verificaram-se também diferenças significativas para entre o isolado Cy249 e um grupo constituído pelos isolados Cy233, Cy238, Cy239, Cy247, Cy250, Cy253, Cy254, Cy258 e Cy259. Analogamente, o mesmo se verificou para os isolados Cy242, Cy246 e Cy248 para o extremo oposto onde se encontra o isolado Cy261 (Figura 3.5).

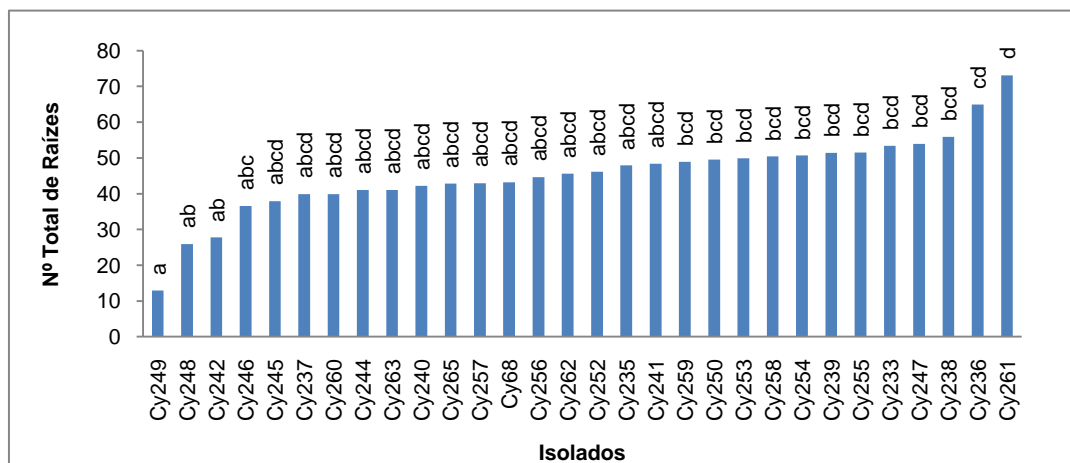


Figura 3.5. Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no número total de raízes, em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD)(Anexo A).

Comparando os isolados entre si, verifica-se que o grupo constituído pelos isolados Cy249, Cy242, Cy248, que estatisticamente não apresentam diferenças significativas entre si, foi o que provocou uma redução mais significativa deste parâmetro.

Analisando as espécies a que pertencem os isolados, verifica-se que, quer os isolados que originaram a formação de um maior número de raízes (Cy236 e Cy261) quer os que mais reduziram o número de raízes (Cy 249, Cy248 e Cy242) pertencem a *Cylindrocarpon* sp4., o que indica variabilidade elevada em sp4, quanto ao poder patogénico.

3.3.3. Comprimento da raiz maior

Relativamente ao comprimento da raiz maior, o valor médio mais elevado foi encontrado para o isolado Cy247 com o valor de 35,0 cm, sendo o mais baixo 12,9 cm para o isolado Cy242 (Figura 3.6). A comparação das médias revelou diferenças significativas entre estes dois isolados situados num dos extremos, Cy242 e Cy249 e o isolado situado no outro extremo Cy247. Os restantes isolados em estudo não diferiram entre si, encontrando-se num grupo homogéneo, como se pode verificar pela Figura 3.6. É de salientar que os dois isolados em que se verificaram os valores mais baixos do comprimento da raiz, identificados como *Cylindrocarpon* sp4, foram igualmente aqueles em que se registou presença do menor número de raízes. Contudo, e tal como sucedeu com o parâmetro analisado anteriormente, verificou-se que o isolado que menos reduziu o comprimento da raiz (Cy247) pertencia igualmente à espécie *Cylindrocarpon* sp4.

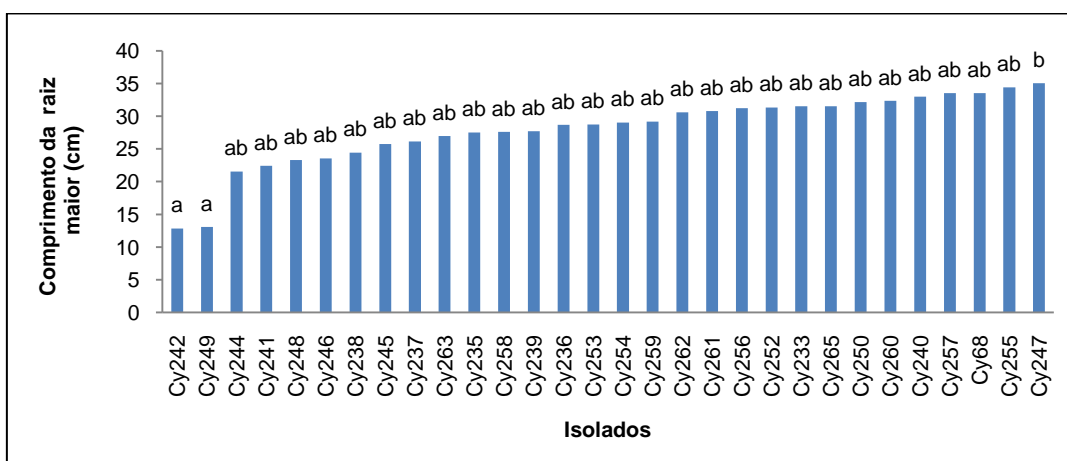


Figura 3.6. Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no comprimento da raiz mais comprida (cm), em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD)(Anexo A).

3.3.4. Comprimento do lançamento maior

Quanto ao parâmetro comprimento do lançamento maior, o valor mais elevado verificou-se para o isolado Cy253 com o valor médio de 24,9 cm, tendo sido o mais baixo de 9,1 cm registado para o isolado Cy242. A comparação das médias dos

comprimentos não evidenciou qualquer diferença significativa entre os isolados em estudo, como se pode verificar na Figura 3.7. Este facto pode dever-se a heterogeneidade dos valores encontrados para este parâmetro para cada um dos isolados, aquando o levantamento do ensaio. Poder-se-iam ter conseguido resultados mais satisfatórios para este parâmetro, aumentando o número de repetições.

É de referir novamente que, tal como nos dois parâmetros anteriores, mais uma vez se verificam os valores mais baixos para os isolados Cy242 e Cy249, agrupados em *Cylindrocarpon* sp4.

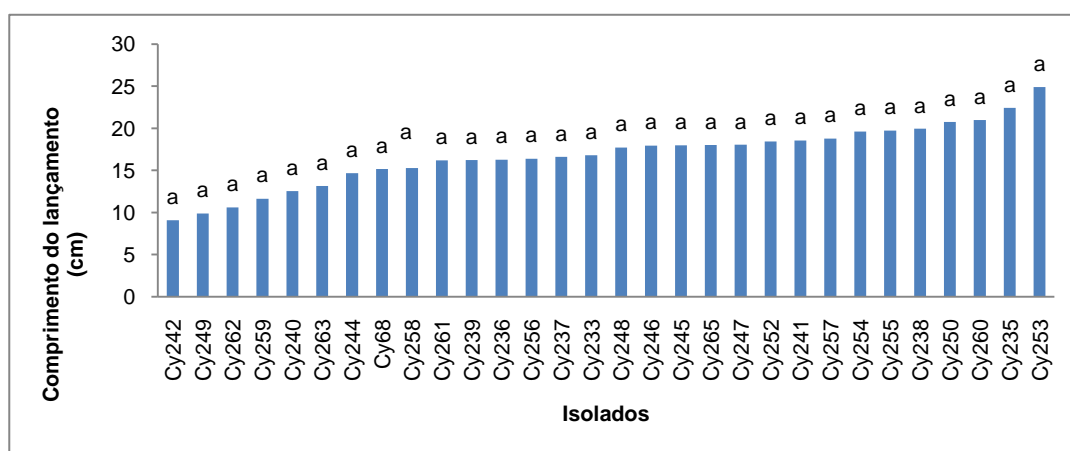


Figura 3.7. Influência de 30 isolados de *Cylindrocarpon* spp., no comprimento do lançamento (cm), em plantas de videira da casta Touriga Nacional. Cy, isolados de *Cylindrocarpon* spp.. Os valores médios afectados pela mesma letra não diferem significativamente para $\alpha=0,05$ (Teste de Tukey HSD)(Anexo A).

Em suma, a análise dos resultados obtidos no ensaio de patogenicidade, para os isolados obtidos a partir de videiras com sintomas de doença, permite concluir que todos os isolados demonstraram ser virulentos, tendo sido reisolados de todas as videiras presentes no ensaio.

Verificou-se ainda uma certa concordância dos resultados dos três parâmetros de crescimento avaliados. Assim, os isolados em que as videiras apresentaram menor número de raízes, raízes de menor comprimento e lançamentos mais curtos, foram os isolados Cy239 (*C. pauciseptatum*) e Cy242 (*Cylindrocarpon* sp4). Mediante a observação da Figura 3.4 verifica-se que o isolado com maior percentagem de reisolamento é o isolado Cy242, a par com o isolado Cy246 (*Cylindrocarpon* sp4) com 75% de média de reisolamento. O isolado Cy239 (*C. pauciseptatum*) apresenta uma média de reisolamento de 20% o que contradiz, de alguma maneira, os resultados observados para os três parâmetros de crescimento. No entanto, para o isolado Cy242

os resultados verificados para os três parâmetros em estudo, juntamente com a percentagem de reisolamento do mesmo, revelam que este, provavelmente, se trata do isolado mais virulento, presente nesta colecção. Os isolados que aparentam ser os menos virulentos, Cy250 e Cy252, pertencem às espécies *C. macrodidymum* (Cy250) e *C. liriodendri* (Cy252). Este facto é um pouco contraditório com a bibliografia disponível, visto todos os isolados com menor percentagem de reisolamento pertencerem às espécies *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* e *C. pauciseptatum*, sendo estas consideradas, actualmente, como os principais agentes causadores do pé-negro da videira. Esta ocorrência não é totalmente apoiada pelos restantes parâmetros de crescimento, pois existe alguma heterogeneidade nos valores verificados para cada isolado. Outros isolados de cada uma das espécies referidas, revelaram-se mais virulentos do que Cy250 e Cy252.

A percentagem de reisolamento do isolado Cy239, identificado como *C. pauciseptatum*, levanta algumas dúvidas relativamente aos resultados observados nos parâmetros de crescimento ensaiados, que demonstravam a possibilidade de se tratar também de um dos isolados mais virulentos da colecção. De qualquer maneira pode afirmar-se que as videiras inoculadas com estes isolados foram as que apresentaram sintomas mais evidentes da doença.

Para isolado Cy233, provavelmente pertencente a uma nova espécie, foi confirmada a sua patogenicidade, com uma percentagem de reisolamento de 46,67. Para todos os outros parâmetros de crescimento apresentou valores intermédios, comparativamente aos outros isolados em estudo. Por conseguinte, impõe-se a continuação do estudo deste isolado, com o objectivo de proceder à sua caracterização detalhada e identificação, bem como ao estudo mais aprofundado da sua patogenicidade, com combinações casta/porta enxerto diferentes, e alargando o número de parâmetros de crescimento a serem avaliados.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O pé negro da videira é uma importante doença a nível mundial causadora de avultados prejuízos para produtores e viveiristas.

Ao longo deste estudo foram analisadas videiras jovens que apresentavam sintomas de declínio, provenientes da região da Vidigueira, das quais se isolaram diversas espécies de fungos do género *Cylindrocarpon*. Os resultados obtidos para as características morfológicas e moleculares da colecção de 33 isolados, obtidos a partir

da zona basal das referidas videiras, revelaram a presença das espécies mais comumente referidas como responsáveis pelo pé negro da videira. Ao longo deste trabalho foi possível identificar e caracterizar as espécies *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* e *C. pauciseptatum*, pertencentes ao complexo *C. destructans*, bem como sp3, sp4 e sp12, que estão em fase de descrição, no âmbito de um trabalho de doutoramento.

Foi também possível detectar uma espécie que apresentou diferenças a nível cultural e que não se enquadrava a nível molecular com nenhum dos isolados de referência utilizados. Trata-se do isolado Cy233, que foi obtido a partir de uma videira da casta Touriga Nacional enxertada em 110R. As características biométricas dos diferentes esporos produzidos por esta espécie aproximaram-se das descritas para *C. pauciseptatum* para os esporos com 3 septos, mas diferiram no que diz respeito a esporos com 2 septos, tendo-se verificado para estes esporos os valores mais elevados dentro a colecção estudada.

A nível dos ensaios de patogenicidade, verificou-se que o isolado que apresentou maior virulência foi Cy242, pertencente a *Cylindrocarpon* sp4. No entanto, todos os isolados estudados se revelaram patogénicos, pois foi possível reisolá-los a partir de todas as videiras inoculadas. O isolado Cy233, quanto à virulência, apresentou um comportamento intermédio, comparativamente aos restantes.

Desta forma conclui-se que todas as espécies descritas como as principais causadoras do pé negro da videira se encontravam presentes na vinha com sintomas de declínio alvo do nosso estudo, assim como uma possível nova espécie que até hoje não tinha sido encontrada e descrita no país.

Tendo em conta os resultados obtidos e as principais conclusões obtidas, associados ao elevado interesse de que se revestem os estudos e investigação sobre o pé negro da videira para o sector vitivinícola, perspectivam-se como linhas de investigação para o futuro, para esclarecimento de dúvidas levantadas por este trabalho e aprofundar aspectos nele referidos e iniciados.

São de destacar a continuação da prospecção em campos de pés-mãe de porta-enxertos, viveiros e vinhas, com objectivo de avaliar a evolução da população de *Cylindrocarpon* spp., assim como novos meios de luta que possam complementar ou constituir alternativa para os actualmente utilizados.

Relativamente à presença de uma nova espécie do género *Cylindrocarpon* spp. no nosso país, são de recomendar estudos mais aprofundados, de forma a finalizar a sua

caracterização, nomeadamente verificar se forma ou não estados teleomórficos, efectuar estudos sobre o seu comportamento sexual, e verificar a formação de esporos em meios diferentes do utilizado no decorrer deste trabalho. Seria também recomendado a continuação dos estudos de patogenicidade em diferentes combinações casta/porta-enxerto para confirmação do grau de virulência para *Vitis* spp., assim como, continuar com os estudos a nível molecular, tendo em conta os resultados obtidos para marcadores RAPD e ISSR, por forma a tentar um melhor enquadramento deste isolado dentro do género *Cylindrocarpon*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreo, E., Bettuci, L., & Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp. associated with black disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 39, 446-452.

Adalat, K., Whiting, C., Rooney, S., & Gubler, W. D. (2000). Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 92-99.

Alaniz, S., Armengol, J., García-Jiménez, J., Adab-Campos, P., & León, M. (2009a). A Multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum* and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant disease* 93, 821-825.

Alaniz, S., Armengol, J., León, M., García-Jiménez, J., & Abad-Campos, P. (2009). Analysis of genetic and virulence diversity of *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum* associated with black foot disease of grapevine. *Mycological Research* 113, 16-23.

Alaniz, S., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., & Armengol, J. (2010). Susceptibility of grapevine rootstocks to *Cylindrocarpon liriodendri* and *C. macrodidymum*. *Scientia Horticulturae* 125, 305-308.

Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad, P., & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease* 91, 1187-1193.

Alberts, B., Bray, D., & Lewis, M. (1994). *Molecular biology of the cell*. 3 ed. New York: Garland.

Alves, A., Phillips, Alan, J. L., Henriques, I., & Correia, A. (2007). Rapid Differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* , 158, 112-121.

Armengol, J., Vicent, A., Torne, L., Garcia-Figueroles, F., & Garcia-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine decline in Spain: a three year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S325-S329.

Auger, J., Esterio, M., & Pérez, I. (2007). First report of Black Foot Disease of Grapevine Caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. *Plant Disease* 91, 470.

Bleach, C. M., Jones, E. E., & Jaspers, M. V. (2009). Hot water treatment for elimination of *Cylindrocarpon* species from infected grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 183.

Bonello, P., Pearce, R., Watt, F., & Grime, G. W. (1991). An induced papilla response in primary roots of Scots pine challenged in vitro with *Cylindrocarpon destructum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 213-228.

Booth, C. (1967). *Nectria radicola*. *Descriptions of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria*, nº148. Kew: Commonwealth Mycological Institute.

- Booth, C. (1966). The Genus *Cylindrocarpon*. *Mycological papers* (104), 1-54.
- Borja, I., Solheim, H., Hietala, A. M., & Fosdal, C. G. (2006). Etiology and realtime polymerase chain reaction-based detection of *Gremmeniella* - and *Phomopsis* - associated disease in Norway spruce seedling. *Phytopathology* 96, 1305-1314.
- Boubals, D. (1994). Etat actuel des problèmes posés par les maladies du bois entraînant des dépérissements de la vigne: (eutypiose, esca, bois noir). *Progrès Agricole et Viticole* 111, 125-131.
- Brayford, D. (1987). CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, Set 93, Nos. 921-930. *Mycopathologia* 100, 115-134.
- Brayford, D. (1993). *Cylindrocarpon*. In *Methods for Research in Soilborn Phytopathogenic Fungi*. (L. L. Singleton, J. D. Mihail, & C. M. Rush, Eds.) *American Phytopathological Society*, 103-106.
- Brayford, D., Honda, B. M., Mantiri, F. R., & Samuels, G. J. (2004). *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: The *Nectria mammoidea* group and species lacking macroconidia. *Mycologia* 96, 572-597.
- bridge, P. D., Pearce, D. A., Rivera, A., & Rutherford, M. A. (1997). VNTR derived oligonucleotides as PCR primers for population studies in filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 24, 426-430.
- Bruno, G., Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., & Sparapano, L. (17-20 September 2001). Biological activity of chitosan and its derivatives on plant pathogenic or antagonistic fungi and host plants. *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia* (pp. 104-106). Évora, Portugal: University of Évora.
- Cabral, A. (2002). *Caracterização de Isolados do Género Cylindrocarpon Causadores do Pé-Negro da Videira*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2008). Multigene sequence analyses reveal novel *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine (*Vitis* spp.). *Abstracts 6th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Esca and Grapevine Declines*.
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20, 2380.
- Chouirei, E., Jreijiri, F., El Amil, R., Chlela, P., Bugaret, Y., Liminana, J. M., et al. (2009). First report of black foot disease associated with *Cylindrocarpon* sp. in Lebanon. *Journal of Plant Pathology* 91, 237.

- Cohen, S., Allasia, V., Venard, P., Notter, S., Vernière, C. H., & Panabières, F. (2003). Intraspecific variation in *Phytophthora citrophora* from citrus trees in eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology* 109, 791-805.
- Cooke, & Harkness. (1884). *Fusarium oxysporum*. *Grevillea* 12, 97.
- Cotrim, H., & Pais, M. S. (1998). A Biologia Molecular na conservação biológica: o caso de RAPD em *Silene rothmaleri* P.Silva. *Boletim de Biotecnologia* , 12-16.
- Crous, P. W., Swart, L., & Coertze, S. (2001). the effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S464-S466.
- Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzyme: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 71, 773-782.
- Dice, L. R. (1954). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297 - 302.
- Dubos, B. (1999). Les maladies cryptogamiques de la vigne: les champignons parasites des organes herbâces et du bois de la vigne. 174 pp.
- Dubrovsky, S., & Fabritius, A. (2007). Occurrence of *Cylindrocarpon* spp. in nursery grapevines in California. *Phytopathologia Mediterranea* , 46, 84-86.
- Dumot, V., Courlit, Y., Roulland, C., & Larignon, P. (1999). La maladie du pied noir dans le vignoble Charentais. *Phytoma* 516, 30-33.
- Edwards, J., & Pascoe, I. G. (2004). Occurrence of *Phaeomoniella* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* 33, 273-279.
- Elbakali, A. M., Lilja, A., Hantula, J., & Martin, M. (2003). Identification of Spanish isolates of *Rhizoctonia solani* from potato by anastomosis grouping, ITS-RFLP and RAMS-fingerprinting. *Phytopathologia Mediterranea* 42, 167-176.
- Fisher, M., & Kassemeyer, H. H. (2003). Fungi associated with Esca Disease of grapevine in Germany. *Vitis* , 42, 109-116.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 116, 255-265.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2001b). Diagnosis of fungal disease and their involvement in dieback disease of young vines. *Wynboer, Dezembro* (www.wynboer.co.za/recentarticles/articles.ph3).

- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004a). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 33, 313-315.
- Fourie, P. H., & Halleen, F. (2004b). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* 88, 1241-1245.
- Galet, P. (1995). *Précis de pathologie Viticole* (2ème ed.). Montpellier: Imprimerie JF, 264 pp.
- Garrido, L. R., Sônego, O. R., & Urben, A. F. (2004). *Cylindrocarpon destructans* causador do pé-negro da videira no Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 29.
- Gatica, M., Césari, C., Magnin, S., & Dupont, J. (2001). *Phaeoacremonium* species and *Phaeomoniella chlamydospora* in vines showing "hoja de malvon" and young vine decline symptoms in Argentina. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S317-S324.
- Gerlach, W., & Nilsson, L. (1963). Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Cylindrocarpon* W. V. *Nectria radicola* n.sp., die bisher unbekannte Hauptfruchtform von *Cylindrocarpon radicola* W. *Phytopathologische Zeitschrift*, 48, 251.
- Govi, G. (1952). Due specie di *Cylindrocarpon* isolate da fruttiferi. *Annali della Sperimentazione Agraria Nuovaserie* 6, 793.
- Graham, A. (2007). Hot water treatment of grapevine rootstocks grown in a cool climate. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 124.
- Gramaje, D., Alaniz, S., Abad-Campos, P., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2010). Effect of hot water treatment in vitro on conidial germination and mycelial growth of grapevine trunk pathogens. *Annals of Applied Biology*, 231-241.
- Gramaje, D., Armengol, J., Salazar, D., López-Cortés, I., & García-Jiménez, J. (2009b). Effect of hot water treatments above 50°C on grapevine viability and survival of Petri disease pathogens. *Crop Protection* 28, 280-285.
- Gramaje, D., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2008). Sensitivity of Petri disease pathogens to hot water treatments in vitro. *Annals of Applied Biology* 153, 95-103.
- Grasso, S. (1984). Infezioni di *Fusarium oxysporum* e di *Cylindrocarpon destructans* associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* (34), 59-63.
- Grasso, S., & Magnano di San Lio, G. (1975). Infezioni di *Cylindrocarpon obtusisporum* su piante di vite in Sicilia. *Vitis* 14, 36-39.
- Groenewald, M., Kang, J. C., Crous, P. W., & Gams, W. (2001). ITS and beta-tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycological Research* 105, 651-657.

Gubler, W. D., Baumgartner, K., Browne, G. T., Eskalen, A., Rooney Latham, S., Petit, E., et al. (2004). Root disease of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology* 33, 157-165.

Habib, W., Pichierrie, A., Masiello, N., Pollastro, S., & Faretra, F. (2009). Application of hot water treatment to control *Phaeomoniella chlamydospora* in grapevine plant propagation materials. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 186.

Halleen, F., Crous, P. W., & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved on the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32, 47-52.

Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2006a). A review of black foot disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S55-67.

Halleen, F., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2007). Control of black foot disease in grapevine nurseries. *Plant Pathology* 56, 637-645.

Halleen, F., Schroers, H.-J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (Neonectria) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50, 431-455.

Hallen, F., Schroers, H.-J., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. W. (2006b). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main casual agent of black foot diseases of grapevines. *Studies in Mycology* 55, 227-234.

Hantula, J., Dusabenyagasani, M., & Hamelin, R. C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology* 26, 159-166.

Hantula, J., Lilja, A., & Parikka, P. (1997). Genetic variation and host specificity of *Phytophthora cactorum* isolated in Europe. *Mycological Research* 101, 565-572.

Hawksworth, D. L., Dirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N. (1995). *Ainworth & Bisby's Dictionary of Fungi* (8th ed.). Surrey: International Mycological Institute, CAB International.

Jaspers, M. V. (2001). Effect of fungicides, in vitro, on germination and growth of *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S453-S458.

Larignon, P. (1999). Black Foot Disease in France. In I. proceedings, & L. Morton (Ed.), *Black goo: Symptoms and Occurrence of Grape Declines* (pp. 89-90). Fort Valley, Virginia, USA: International Ampelography Society.

Laukart, N., Edwards, J., Pascoe, I. G., & Nguyen, N. K. (2001). Curative treatments trialed on grapevines infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S459-S458.

- MacDonald, J. D., & Butler, E. E. (1981). Cylindrocarpon root rot of tulip poplar. *Plant Disease* 65, 154-157.
- Mahuku, G. S., & Riascos, J. J. (2004). Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. *European Journal of Plant Pathology* 110, 253-263.
- Mahuku, G. S., Henríquez, M. A., Muñoz, J., & Buruchara, R. (2002). Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogens. *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 92, 580-589.
- Maluta, D., & Larignon. (1991). Pied-noir: mieus vaut prévenir. *Viti Novembre* , 71-72.
- Mantiri, F. R., Samuels, G. J., Rahe, J. E., & Honda, B. M. (2001). Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 79, 334-340.
- Martínez, J. R., Salazar, M. D., & López, I. (2004). Prevencion y consideraciones básicas ante la presencia de la enfermedad de Petri. *La semana vitivinícola nº 3000* , 406-409.
- Mil'ko, A. A. (1959). On the specific composition of the soil fungi causing rot of vine roots damaged by phylloxera. *Mold. Fil. Akad. Nauk S.S.S.R.* 8, 55-66.
- Mishra, P., Fox, R. T., & Culham, A. (2003). Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analysis revealed high genetic diversity recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology* 143, 291-301.
- Mohammadi, H., Alaniz, S., Banihashemi, Z., & Armengol, J. (2009). Characterization of *Cylindrocarpon liriodendri* Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Iran. *Journal of Phytopathology* 157, 642-645.
- Mugnai, L., Graniti, A., & Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404-416.
- Nascimento, T., Rego, C., & Oliveira, H. (2007). Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 218-224.
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 76, 5269-5273.
- Oliveira, H., Nascimento, T., & Rego, C. (1998a). Crown gall and *Cylindrocarpon* black-foot disease of grapevine in Portugal. *Proceedings of the 19th International Geisenheim Workshop on Grapevine Grafting, 1998*, (pp. 23-24). Geisenheim, 2-4 July.

Oliveira, H., Rego, C., & Nascimento, T. (2003). Doenças do lenho da videira: uma ameaça à produção estável em vitivinicultura. *Actas do 1º Colóquio Vitivinícola da Estremadura*, (pp. 96-113). Torres Vedras, 6 e 7 Junho.

Pascoe, I., & Cottral, E. (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 68-75.

Peterson, E. A. (1958). Observations of fungi associated with plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 4, 257-265.

Petit, E. L. (2005). Characterization and Control of Black Foot Disease of Grapevine in California. *Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Pathology, University of California, Davis*, 93pp.

Petit, E., & Gubler, W. D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. *Plant Disease* 89, 1051-1059.

Petit, E., & Gubler, W. D. (2007). First Report of *Cylindrocarpon liriodendri* Causing Black Foot Disease of Grapevine in California. *Plant Disease* 91, 1060.

Pujol, X. (1993). Contribution à l'amélioration de la lutte à l'égard de *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten, agent du pied noir de la vigne. *Mémoire de DEA d'Agrochimie, Institut National Polytechnique, École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Toulouse*, 21pp.

Rego, C. (2004). *Estudo e caracterização de fungos do género Cylindrocarpon (Neonectria) responsáveis pelo pé-negro da videira em Portugal*. Dissertação apresentada ao Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida" - Instituto Superior de Agronomia, para acesso à categoria de Investigador Auxiliar, ISA/LPVVA, UTL, Lisboa.

Rego, C. (1994). Nova e grave doença da videira em Portugal. Agente responsável: *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten. *Publicação do Laboratório de Patologia Vegetal "Veríssimo de Almeida"* 67, 1-4.

Rego, C., Carvalho, A., Nascimento, T., & Oliveira, H. (2001a). First approach on the understanding of inoculum sources of *Cylindrocarpon destructans* and *Phaeomoniella chlamydospora* concerning grapevine rootstocks in Portugal. *IOBC/WPRS Bulletin* 24, 67-72.

Rego, C., Farropas, L., Nascimento, T., Cabral, A., & Oliveira, H. (2006a). Black foot of grapevine, sensitivity of *Cylindrocarpon destructans* to fungicides. *Phytopathologia Mediterranea* 45, S93-S100.

Rego, C., Nascimento, T., & Oliveira, H. (2001b). Characterization of *Cylindrocarpon destructans* isolates from grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S343-S350.

Rego, C., Nascimento, T., & Oliveira, H. (2001c). Estudo sobre os fungos *Cylindrocarpon destructans* e *Phaeomoniella chlamydospora* em materiais vitícolas. *Actas 5º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, Vol. 1, 23 - 25 Maio, pp. 27-35. Évora.

Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., & Oliveira, H. (2005). Fungi associated with young vine decline in Portugal: results of nine years surveys. *Abstracts OILB-Meeting Working Group of Integrated Control in Viticulture*. Darfo Boario, Italy.

Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Silva, M. J., & Oliveira, H. (2009). Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 128-135.

Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., & Phillips, A. (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 76-79.

Rego, C., Pádua, M., Carvalho, A., & Oliveira, H. (1998). Contributo para o estudo da espécie *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) Scholten em material vitícola nacional. *Actas 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, (pp. 129-135). Évora, Vol. 1, 20-22 Maio.

Rhazi, M., Desbrières, J., Tolaimate, A., Alagui, A., & Vottero, P. (2000). investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polymer International* 49, 337-344.

Rooney, S. N., & Gubler, W. D. (2001). Effect of hot water treatment on eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S467-S472.

Rossman, A., Samuels, G. J., Rogerson, C. T., & Lowen, R. (1999). Genera of Bionectraceae, Hypocreaceae and Nectraceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology* 42, 1-248.

Rumbos, I. C., & Rumbou, A. (2001). Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S330-S335.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuels, G., & Brayford, D. (1990). Variation in *Nectria radicola* and its anamorph *Cylindrocarpon destructans*. *Mycological Research* 94, 433-442.

Sánchez, R., Rubio, J. A., & Yuste, J. (2004). Relación entre la zona de afección del portainjerto y la presencia de especies fúngicas en plantaciones jóvenes de vid en Castilla y León. *Actas 6º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, (pp. 357-364). Évora, Vol. 1, 26-28 de Maio.

Sánchez-Hernández, M. E., Ruiz Dávila, A., & Trapero-Casas, A. (1998b). La "seca" de olivos jóvenes II: identificación y patogenicidad de los hongos asociados con podredumbres radiculares. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 24, 581-602.

Scheck, H. J., Vasquez, S. J., Fogle, D., & Gubler, W. D. (1998a). First report of Black-foot Disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of Grapevine in California. *Plant Disease* 82, 448.

Scheck, H. J., Vasquez, S. J., Fogle, D., & Gubler, W. D. (1998b). Grape growers report losses to black-foot and grapevine decline. *California Agriculture* 52, 19-23.

Schoch, C. L., Crous, P. W., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2000). Phylogeny of *Calonectria* and selected hypocrealean genera with cylindrical macroconidia. *Studies in Mycology* 45, 45-62.

Schoers, H.-J., Zerjav, M., Munda, A., Halleen, F., & Crous, P. W. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycological Research* 112, 82-92.

Scholten, G. (1964). *Nectria radicola* en *Thielaviopsis basicola* als parasiter van *Cyclamen persicum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 70, 61-65.

Seifert, K. A., McMullen, C. R., Yee, D., Reeleder, R. D., & Dobinson, K. F. (2003). Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology* 95, 1533-1542.

Serra, S., Mannoni, M. A., Ligios, V., & Demontis, A. (2009). Effect of combined hot water and cyproconazole on the eradication of *Phaeomoniella chlamydospora* from grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 185-186.

Talhinhas, P., Neves-Martins, J., & Leitão, J. (2003). AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among lupinus spp. *Plant Breeding* 122, 507-510.

Taylor, R. H. (1956). *Cylindrocarpon radicola* Wr.: the recording of a new fungus on grapes in Victoria. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 22, 291.

Tingley, S. V., & Tufo, J. P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic markers. *Plant Physiology* 101, 349-352.

Tooley, P. W., Óneill, N. R., Goley, E. D., & Carras, M. M. (2000). Assessment of diversity in *Claviceps africana* and other *Claviceps* by RAM and AFLP analysis. *Phytopathology* 90, 1126-1130.

Vakalounakis, D. J., & Fragkiadakis, G. A. (1999). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compability, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89, 161-168.

Waite, H., & May, P. (2005). The effects of hot water treatment, hydration and order of nurserie operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars. *Phytopathologia Mediterranea* 44, 144-152.

Waite, H., & Morton, L. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 5-17.

Whitelaw-Weckert, M. A., Nair, N. G., Lamont, R., Alonso, M., Priest, M. J., & Huang, R. (2007). Root infection of *Vitis vinifera* by *Cylindrocarpon liriodendri* in Australia. *Australasian Plant Pathology* , 36, 403-406.

Whiting, E. C., Khan, A., & Gubler, W. D. (2001). Effect of temperature and water potential on survival and mycelial growth of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Plant Disease* 85, 195-201.

Williams, J., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

Wollenweber, H. W. (1917). *Fusaria Autographice delineata*. *Annales Mycologici* 15, 1-56.

Wollenweber, H. W. (1913). *Ramularia, Mycosphaerella, Nectria, Calonectria*. *Phytopathology* 3, 197-242.

Ylimäki, A. (1967). Root rot as cause of red clover decline in leys in Finland. *Annales Agriculturae Fenniae, Suppl.1* , 59.

Zazzerini, A., & Marte, M. (1976). *Cylindrocarpon radicicola* (Zins.) Scholten probable agenta di una nuova malattia dell'olivo (*Olea europea* L.). *Phytopathologia Mediterranea* 15, 90-97.

Zhou, S., Smith, D. R., & Stanosz, G. R. (2001). Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycological Research* 105, 919-926.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.

Zinssmeister, C. L. (1918). *Ramularia* root-rots of ginseng. *Phytopathologia* 8, 557-571.

Anexos

Anexo A

Ensaio de Patogenicidade

Análises de Variância e Médias do Número Total de Raízes, do Comprimento da Raiz Maior, do Comprimento do Lançamento Maior e das Percentagens de Reisolamento das Videiras Inoculadas com Isolados de *Cylindrocarpon* spp. e das Plantas Testemunha.